





دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

۹۴۵۸۹۱۰۳

پایان نامه دکتری تخصصی

بهداشت آبزیان

عنوان:

بررسی امکان ارتقای رشد و بقای بچه میگوهای سفید  
غربی *Litopenaeus vannamei* توسط برخی جلبکهای  
دریایی خلیج فارس

استاد راهنما:

دکتر مهرزاد مصباح

اساتید مشاور:

ب

دکتر رحیم پیغان  
دکتر شاپور کاکولکی

نگارش:

عقیل دشتیان نسب

خردادماه ۹۴

بسمه تعالی

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

(نتیجه ارزشیابی پایان نامه‌ی دکتری تخصصی)

پایان‌نامه‌ی آقای عقیل دشتیان نسب دانشجوی رشته: بهداشت آبزیان از دانشکده دامپزشکی به شماره دانشجویی: ۹۰۵۸۹۰۴ تحت عنوان: بررسی امکان ارتقای رشد و بقای بچه میگوهای سفید غربی *Litopenaeus vannamei* توسط برخی جلبکهای دریایی خلیج فارس جهت اخذ مدرک: دکتری تخصصی بهداشت آبزیان در تاریخ: ۱۳۹۴/۰۳/۹ توسط هیأت محترم داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و بلرجه: عالی به تصویب رسید

اعضای هیأت داوران	مرتبه علمی	سمت	امضا
دکتر مهرزاد مصباح	دانشیار	استاد راهنمای اول	
دکتر رحیم پیغان	استاد	استاد مشاور	

دکتر شاپور کاکولکی	استادیار	استاد مشاور
دکتر مجتبیٰ علیشاهی	دانشیار	استاد داور
دکتر داریوش غریبی	استادیار	استاد داور
دکتر جاسم غفله مرمضی	دانشیار	استاد داور
دکتر غلامحسین خواجه	استاد	استاد داور
دکتر محمد راضی جلالی	دانشیار	استاد ناظر
دکتر مهرزاد مصباح	دانشیار	مدیر گروه
دکتر محمد راضی جلالی	دانشیار	معاون پژوهشی دانشکده
دکتر عبدالرحمان راسخ	استاد	مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه

## گواهی صحت و اصالت

عنوان پایان نامه: بررسی امکان ارتقای رشد و بقای بچه میگوهای سفید غربی *Litopenaeus vannamei* توسط برخی جلبکهای دریایی خلیج فارس پایان نامه‌ی آقای عقیل دشتیان نسب دانشجوی رشته بهداشت آبزیان از دانشکده دامپزشکی به شماره دانشجویی ۹۰۵۸۹۰۴ تحت راهنمایی دکتر مهرزاد مصباح و مشاوره دکتر رحیم پیغان و دکتر شاپور کاکولکی گواهی می‌دهم که:

۱- تحقیقات ارائه شده در این پایان نامه حاصل مطالعات علمی و عملی شخص اینجانب بوده و صحت و اصالت تمام مطالب مندرج در آن را تایید می‌کنم.

۲- در صورت استفاده از آثار دیگران، مشخصات کامل آن‌ها را در منابع ذکر نموده‌ام.

۳- تاکنون مطالب درج شده در این پایان نامه، توسط اینجانب یا شخص دیگری به منظور اخذ هر نوع مدرک یا امتیازی به هیچ مرجعی تسلیم نشده و بعد از این نیز نخواهد شد.

۴- در تدوین متن پایان نامه، شیوه‌نامه مصوب دانشکده را رعایت نموده‌ام.

۵- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و مقالات مستخرج از آن، ذیل نام دانشگاه شهید چمران اهواز (Shahid Chamran University of Ahvaz) به چاپ خواهد رسید.

۶- حقوق معنوی تمامی افرادی که در این پایان نامه تاثیرگذار بوده اند (اساتید راهنما و مشاور) در مقالات مستخرج از آن رعایت خواهد شد.

۷- در صورت استفاده از موجودات زنده یا بافت های آن‌ها، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مندرج در منشور موازین و اصول اخلاق پژوهش وزارت علوم، تحقیقات و فناوری رعایت شده است.

در صورت اثبات تخلف از مندرجات فوق، مسئولیت هر گونه پاسخگویی به اشخاص حقیقی و حقوقی و مراجع ذیصلاح بر عهده اینجانب بوده و دانشگاه شهید چمران هیچ مسئولیتی بر عهده نخواهد داشت . همچنین در صورت تضییع حقوق و منافع دانشگاه، حق پیگیری موضوع در مراجع ذیصلاح و اعمال قوانین مربوطه برای دانشگاه شهید چمران در حال و آینده محفوظ بوده و اینجانب مسئول پرداخت کلیه خسارات وارده خواهم بود.

۱۳۹۴/۰۳/۹

عقیل دشتیان نسب

#### مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به غیر نیست. استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

چکیده .....	۱
فصل اول .....	۴
مقدمه و هدف .....	۴
الف- مقدمه و هدف .....	۵
الف-۱- مقدمه: .....	۵
ب- اهداف تحقیق .....	۱۲
فصل ۲ .....	۱۴
مروری بر منابع .....	۱۴
الف- نگاه کلی بر جلبکهای دریایی .....	۱۵
الف-۱- انواع جلبکهای دریایی .....	۱۵
الف-۲- شکل شناسی جلبک های دریایی .....	۱۶
الف-۳- توزیع پراکندگی جلبک ها .....	۱۸
الف-۴- موارد استفاده جلبکهای دریایی .....	۲۰
الف-۴-۱- جلبکهای دریایی به عنوان غذای انسان .....	۲۰
الف-۴-۲- سبزی استفاده های جلبکهای دریایی .....	۲۲
ب- مروری بر فعالتهای بیولوژیک عصاره های جلبکی .....	۲۵
ب-۱- فعالتهای ضدباکتریایی جلبکهای دریایی .....	۲۵
ب-۲- فعالیت آنزیمی جلبکهای دریایی .....	۲۸
ج- کاربرد جلبکهای دریایی در آبی پروری .....	۳۲
د- غنی سازی آرتمی .....	۳۵
فصل سوم .....	۳۸
مواد و روشها .....	۳۸

الف- مواد و روش کار.....	۳۹
الف-۱- وسایل و مواد مورد نظر.....	۳۹
الف-۱-۱- مواد مورد نظر جهت بررسی فعالیت آنتی باکتریایی.....	۳۹
الف-۱-۲- مواد مورد نظر جهت بررسی اثرات آنتی اکسیدانی.....	۴۰
الف-۱-۳- مواد مورد نظر جهت بررسی فعالیت های رشد و بقای بچه میگو و چالش با باکتری.....	۴۰
الف-۲- تجهیزات و وسایل مورد نظر.....	۴۰
ب- روش کار.....	۴۱
ب-۱- تهیه و آماده سازی جلبکها.....	۴۱
ب-۱-۱- نمونه برداری و شناسایی جلبکها.....	۴۱
ب-۱-۲- عصاره گیی از جلبکها.....	۴۴
ب-۲- بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره ها.....	۴۷
ب-۲-۱- باکتریهای مورد آزمون.....	۴۷
ب-۲-۲- تعیین اثر عصاره جلبکها به روش انتشار در آگار لی روش چاهک در شرایط برون تن.....	۴۸
ب-۲-۳- تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC).....	۵۰
ب-۳- تعیین اثر آنتی اکسیدانی عصاره جلبکهای دریایی در شرایط برون تن.....	۵۱
ب-۴- تهیه و غری سازی آرتمی.....	۵۳
ب-۴-۱- تهیه و تفریح سمیت آرتمی.....	۵۳
ب-۴-۲- بررسی اثر سمیت عصاره های مختلف جلبکهای دریایی برای آرتمی.....	۵۳
ب-۴-۳- غری سازی ناپای آرتمی.....	۵۴

ب-۵- تهی و نگهداری بچه میگوها.....	۵۵
ب-۶- تعیین اثر عصاره جلبکهای منتخب بر کاهش بار آلودگی باکتریایی در شرایط	
درون تن.....	۵۷
ب-۶-۱- تهی و آماده سازی باکتری.....	۵۷
ب-۶-۲- تعیین دز کشنده ۵۰٪ (LD <sub>50</sub> ) باکتری <i>V.harveyi</i> برای میگوی وانامی.....	۵۸
ب-۶-۳- شرایط و روش آزمایش.....	۵۹
ب-۶-۴- روش نمونه برداری و تعیین بار آلودگی.....	۶۱
ب-۷- تعیین درصد بقای بچه میگوها و فاکتورهای رشد.....	۶۲
ب-۸- تعیین میزان مقاومت میگوها در برابر عامل پاتوژن ( <i>V.harveyi</i> ).....	۶۲
ب-۹- آنالیز آماری داده ها.....	۶۳
فصل چهارم.....	۶۵
نتایج.....	۶۵
الف-نتایج شناسایی و آماده سازی جلبکهای دریایی.....	۶۶
الف-۱- نتایج شناسایی جلبکهای دریایی.....	۶۶
الف-۱-۱-شرح مختصری از خصوصیات مورفولوژی جلبکها.....	۶۷
الف-۲- نتایج عصاره گیری از جلبکهای دریایی.....	۷۴
ب- نتایج آزمونهای باکتری شناسی.....	۷۶
ب-۱- نتایج آزمونهای حساسیت.....	۷۶
ب-۲-نتایج MIC و MBC.....	۸۲
ج-نتایج بررسیهای آنژی اکسیدانی.....	۸۶
د-نتایج LC <sub>50</sub> عصاره جلبکها بر ناپای آرتمی.....	۹۵
ه- نتایج بار آلودگی.....	۹۶
و-نتایج رشد و بازماندگی.....	۹۸



فصل پنجم.....	۱۰۷
بحث و نتیجه گیری.....	۱۰۷
الف- فعالیت ضدباکتریایی.....	۱۰۸
ب- فعالیت آنژی اکسیدانی.....	۱۱۳
ج- رشد و بازماندگی.....	۱۲۱
د- مقاومت به ویروسی.....	۱۳۰
فهرست منابع.....	۱۳۲
چکیده انگلیسی.....	۱۵۷

### فهرست نمودارها

نمودار ۴- ۱: نمودار ۴-۱: مقایسه فعالیت آنژی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) عصاره آبی جلبکهای مختلف به روش DPPH. بارها نشانگر اختلاف معطر است.....	۸۷
نمودار ۴- ۲: مقایسه فعالیت آنژی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) عصاره اتانولی جلبکهای مختلف به روش DPPH. بارها نشانگر انحراف معطر می باشند.....	۸۸
نمودار ۴- ۳: مقایسه فعالیت آنژی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) عصاره متانولی جلبکهای مختلف به روش DPPH. بارها نشانگر انحراف معطر می باشند.....	۸۸
نمودار ۴- ۴: مقایسه فعالیت آنژی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) عصاره کلروفرمی جلبکهای مختلف به روش DPPH <sup>*</sup> . بارها میزان انحراف معطر را نشان می دهند.....	۸۹
نمودار ۴- ۵: مقایسه فعالیت آنژی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظتهای مختلف عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک <i>S. angustifolium</i> با ویتامین C به روش حذف DPPH.....	۸۹

- نمودار ۴- ۶: مقایسه فعالیت آنژی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظت‌های مختلف  
عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *S.ilicifolium* با ویتامین C به روش  
حذف DPPH..... ۹۰
- نمودار ۴- ۷: مقایسه فعالیت آنژی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظت‌های مختلف  
عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *G.corticata* با ویتامین C به روش حذف  
DPPH..... ۹۱
- نمودار ۴- ۸: مقایسه فعالیت آنژی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظت‌های مختلف  
عصاره آبی، عصاره اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *C.iyengari* با ویتامین C به روش حذف  
DPPH..... ۹۱
- نمودار ۴- ۹: مقایسه فعالیت آنژی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظت‌های مختلف  
عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *K.alvarezii* با ویتامین C به روش حذف  
DPPH..... ۹۲
- نمودار ۴- ۱۰: مقایسه فعالیت آنژی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظت‌های مختلف  
عصاره آبی، عصاره اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *P.borgesseni* با ویتامین C به روش  
حذف DPPH..... ۹۲
- نمودار ۴- ۱۱: مقایسه فعالیت آنژی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظت‌های مختلف  
عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *L.snyderiae* با ویتامین C به روش حذف  
DPPH..... ۹۳

نمودار ۴-۱۲: درصد بقاء بچه میگوهای سفید غربی تغذی شده با آرتمی غری نشده و غری شده با غلظت‌های مختلف عصاره های اتانولی جلبک های مورد آزمون، پرورش یافته در محیط فاقد لی‌واجد باکتری *V.harveyi* پس از ۳۰ روز دوره پرورشی. بارها نشانگر انحراف معکوس هستند..... ۹۹

نمودار ۴-۱۳: تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذی با غذای پای (کنترل منفی-C و کنترل مثبت C+) لی غذای پای به اضافه آرتمی غری سازی شده به وسیله عصاره اتانولی جلبک *S.angustifolium* با دزهای مختلف (۲۰۰ و ۴۰۰ و ۶۰۰ mg/l)..... ۱۰۳

نمودار ۴-۱۴: تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذی با غذای پای (کنترل منفی-C و کنترل مثبت C+) لی غذای پای به اضافه آرتمی غری سازی شده به وسیله عصاره اتانولی جلبک *L.snyderiae* با دزهای مختلف (۲۰۰ و ۴۰۰ و ۶۰۰ mg/l)..... ۱۰۴

نمودار ۴-۱۵: تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذی با غذای پای (کنترل منفی-C و کنترل مثبت C+) لی غذای پای به اضافه آرتمی غری سازی شده به وسیله عصاره اتانولی جلبک *G.corticata* با دزهای مختلف (۳۰۰ و ۶۰۰ و ۹۰۰ mg/l)..... ۱۰۴

نمودار ۴-۱۶: تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذی با غذای پای (کنترل منفی-C و کنترل مثبت C+) لی غذای پای به اضافه

آرتمیسی غری سازی شده به وسیله عصاره اتانولی جلبک *K.alvarezii* با دزهای مختلف (mg/l)

۶۰۰ و ۳۰۰)..... ۱۰۵

نمودار ۴- ۱۷: درصد محافظت کنندگی غلظتهای مختلف عصاره های اتانولی جلبکهای

مورد آزمون در برابر باکتری *V.harveyi*..... ۱۰۶

### فهرست جداول

جدول ۴- ۱: گونه های جداسازی شده در فصول و ایستگاههای مختلف از سواحل

شهرستان بوشهر..... ۶۶

جدول ۴- ۲: فعالیت ضدباکتریایی عصاره های مختلف از جلبکهای دریایی مورد آزمون

..... ۷۴

جدول ۴- ۳: فعالیت ضد باکتریایی عصاره های مختلف جلبکهای دریایی خلیج فارس

جدول ۴- ۴: میانگین  $\pm$  انحراف معطر (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های

جلبک *S.angustifolium* بر باکتریهای مختلف..... ۷۹

جدول ۴- ۵: میانگین  $\pm$  انحراف معطر (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های

جلبک *S.ilicifolium* بر باکتریهای مختلف..... ۸۰

جدول ۴- ۶: میانگین  $\pm$  انحراف معطر (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های

جلبک *C.iyengrii* بر باکتریهای مختلف..... ۸۰

جدول ۴- ۷: میانگین  $\pm$  انحراف معطر (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های

جلبک *K.alvarezii* بر باکتریهای مختلف..... ۸۱

جدول ۴- ۸: میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های

جلبک *G.corticata* بر باکتریهای مختلف..... ۸۱

جدول ۴- ۹: میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های

جلبک *L.snyderiae* بر باکتریهای مختلف..... ۸۱

جدول ۴- ۱۰: میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های

جلبک *P.borgesenii* بر باکتریهای مختلف..... ۸۲

جدول ۴- ۱۱: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

جلبک *S.angustifolium* برای باکتریهای مورد آزمون بر حسب mg/ml..... ۸۳

جدول ۴- ۱۲: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

عصاره های جلبک *S.ilicifolium* برای باکتریهای مورد آزمون..... ۸۴

جدول ۴- ۱۳: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

جلبک *C.iyengaraii* برای باکتریهای مورد آزمون..... ۸۴

جدول ۴- ۱۴: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

جلبک *K.alvarezii* برای باکتریهای مورد آزمون..... ۸۴

جدول ۴- ۱۵: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

جلبک *G.corticata* برای باکتریهای مورد آزمون..... ۸۵

جدول ۴- ۱۶: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

جلبک *L.snyderiae* برای باکتریهای مورد آزمون..... ۸۵

جدول ۴- ۱۷: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

جلبک *P.borgesseni* برای باکتریهای مورد آزمون..... ۸۶

جدول ۴- ۱۸: میزان  $EC_{50}$  عصاره های مختلف جلبکی برای حذف رادیکال  $DPPH^{\cdot}$  به

.....mg/ml ۹۴

جدول ۴- ۱۹: میزان  $LC_{50}$  عصاره های مختلف جلبکی برای ناپای آرتمی بر حسب

.....mg/ml ۹۵

جدول ۴- ۲۰: بار باکتریایی بر حسب  $CFU g^{-1}$  ( $\pm$  انحراف معیله) در بافت هموژن شده

بچه میگوهای پرورش یافته در محیط فاقد لی واجد باکتری *V.harveyi* در فازهای مختلف دوره

آزمایش..... ۹۷

جدول ۴- ۲۱: طول و وزن اولیه، طول و وزن نهایی، وزن کسب شده و درصد نرخ رشد

وئ (SGR) در بچه میگوهای سفید غری غذایی شده با آرتمی غری نشده و غری شده با عصاره

اتانولی جلبک های مختلف، پرورش یافته در محیط فاقد لی واجد باکتری و میری هاروی..... ۱۰۰

جدول ۴- ۲۲: تلفات تجمعی و درصد محافظت کنندگی عصاره اتانولی جلبکهای

مختلف و گروههای شاهد در مواجهه با باکتری و میری هاروی..... ۱۰۲

### فهرست اشکال

شکل ۲- ۱: نمای کلی و اندامک های یک جلبک دریایی..... ۱۷

شکل ۳- ۱: جمع آوری جلبکها به وسیله چنگک..... ۴۲

شکل ۳- ۲: جمع آوری جلبکهای دریایی در منطقه بین جزر و مدی به وسیله دست... ۴۲

- شکل ۳-۳: شستشوی اولیه جلبکهای دریایی با آب شریانی..... ۴۳
- شکل ۳-۴: شستشوی ثانویه جلبکهای دریایی با آب شریانی..... ۴۳
- شکل ۳-۵: پودر جلبکهای خشک شده توسط آسرایب برقی..... ۴۴
- شکل ۳-۶: تهیه عصاره جلبکها به روش خیساندن..... ۴۵
- شکل ۳-۷: تهیه عصاره جلبکها به روش سوکسله..... ۴۵
- شکل ۳-۸: صاف کردن عصاره های تولید شده به روش خیساندن طی سوکسله توسط کاغذ صافی..... ۴۶
- شکل ۳-۹: برگرداندن عصاره های توزین شده به حلال خود جهت نگهداری در فریزر ۲۰- درجه سانسیگراد..... ۴۷
- شکل ۳-۱۰: روش تهیه دیسکهای حاوی عصاره های جلبکی..... ۴۹
- شکل ۳-۱۱: فرمول رادیکال آزاد DPPH و نحوه غی فعال شدن آن..... ۵۲
- شکل ۳-۱۲: سازگارسازی پست لاروهای خریجاری شده قبل از ذخی سازی..... ۵۶
- شکل ۳-۱۳: باکتریهای شستشو شده و سانتریفیوژ شده..... ۵۹
- شکل ۴-۱: جلبک *Sargassum angustifolium*..... ۶۸
- شکل ۴-۲: جلبک *Sargassum ilicifolium*..... ۶۹
- شکل ۴-۳: جلبک *Laurencia snyderiae*..... ۷۰
- شکل ۴-۴: جلبک *Gracilaria corticata*..... ۷۱
- شکل ۴-۵: جلبک *Padina borgesseni* جدا سازی شده از سواحل شهرستان بوشهر..... ۷۲

شکل ۴-۶: جلبک *Kappaphycus alvarezii* جداسازی شده از سواحل شهرستان

بوشهر..... ۷۳

شکل ۴-۷: جلبک *Codium iyengarii* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر..... ۷۴

شکل ۴-۸: اثر ضدباکتریایی برخی از عصاره های جلبکهای جداسازی شده از سواحل

خلیج فارس..... ۷۷



## چکیده

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در آبی‌پروری محدود شده و دانشمندان به دنبال یافتن جایگزین‌هایی برای پیشگیری و کنترل بیماری‌های آبزیان هستند. با توجه به غنی بودن جلبک‌های دریایی از مواد غذایی و ترکیبات بیواکتیو، هدف از اجرای این تحقیق بررسی پتانسیل و امکان استفاده از جلبک‌های بومی خلیج فارس در صنعت تکثیر و پرورش میگو به منظور بهبود کیفیت رشد، بازماندگی و مقاومت پست لاروهای میگو در برابر عوامل بیماری‌زا بخصوص ویبریزیس هست. بدین منظور ۷ گونه جلبک دریایی پرسلولی از سواحل استان بوشهر از سه گروه عمده جلبک‌ها شامل جلبک‌های سبز (*C. iyengarii*)، جلبک‌های قهوه‌ای (*S. angustifolium*)، *S. ilicifolium* و *Padina boergesseni* و جلبک‌های قرمز (*G. corticata*)، *K. alvarezii* و *L. snyderiae* جمع‌آوری و شناسایی شد. سپس عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی از جلبک‌های مذکور به روش خیساندن تهیه شد. در آزمایشگاه فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف جلبک‌ها علیه باکتری‌های گرم مثبت (*S. aureus* و *B. subtilis*) و گرم منفی (*V. harveyi*)، *E. coli* و *V. alginolyticus* به روش انتشار در آگار و بررسی MIC و MBC مورد ارزیابی قرار گرفت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نیز به روش حذف رادیکال آزاد DPPH و تعیین EC<sub>50</sub> بررسی شد. بر اساس نتایج این دو آزمون به جز عصاره آبی که فعالیت ضدباکتریایی کمی داشت، سایر عصاره‌های چهار گونه از جلبک‌ها به نام‌های *S. angustifolium*، *L. snyderiae*، *K. alvarezii* و *G. corticata* جهت آزمایشات تجربی و استفاده در جیره غذایی بچه میگوها، به روش غری‌سازی با آرتیمیا (Bio-Encapsulation) انتخاب شدند. قبل از غری‌سازی آرتیمیا، اثر سمیت عصاره‌های مذکور از طریق تعیین LC<sub>50</sub>، ۲۴ ساعته آن‌ها برای ناپلی آرتیمیا بررسی شد. با استفاده از نتایج این بخش از پروژه، عصاره اتانولی این چهار گونه‌ی جلبکی برای غری‌سازی ناپلی آرتیمیا و استفاده در جیره غذایی بچه میگوها انتخاب شد. پس از غری‌سازی ناپلی آرتیمیا، توسط غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی جلبک‌های منتخب، بچه میگوهای تهیه شده (PL<sub>۲۲</sub>) در ۱۲ گروه و هر گروه با سه تکرار و ۱۰۰ عدد پست لارو در هر تکرار به نام‌های کنترل منفی، کنترل

مثبت،  $S(200)$ ،  $S(400)$ ،  $S(600)$ ،  $L(200)$ ،  $L(400)$ ،  $L(600)$ ،  $G(300)$ ،  $G(600)$ ،  $K(300)$  و  $K(600)$  تیمار بندی شدند. تیمارهای کنترل منفی و کنترل مثبت از جیره غذایی پایه به علاوه آرتیمیای غری سازی نشده و تیمارهای مختلف علاوه بر جیره پایه از آرتیمیای غری سازی شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی جلبک های منتخب طی ۳۰ روز دوره پرورش استفاده کردند. به منظور ایجاد شرایط آلودگی مصنوعی همه تیمارها به جز کنترل منفی از روز اول ذخیره سازی به مدت ۳۰ دقیقه در معرض باکتری ویبریو هاروی با دز غیر کشنده  $10^7$  CFU/ml قرار گرفتند و پس از هر تعویض آب ۱۰ میلی لیتر از این دز به آب پرورش همه تیمارها به جز کنترل منفی اضافه می شد. پس از ۳۰ روز پرورش، درصد بازماندگی، وزن کسب شده و درصد نرخ رشد ویژه در گروه های مختلف بررسی شد. به منظور ارزیابی بار آلودگی ویبریویی، هر ۱۰ روز تعداد ۵ عدد پست لارو به صورت تصادفی از کلیه گروه های شاهد و تیمار نمونه گیری شده و مورد شمارش باکتریایی قرار می گرفتند. نتایج آزمون نشان داد، بار آلودگی ویبریویی گروه کنترل منفی نسبت به همه گروه ها کمتر بود و برعکس آن بار آلودگی در گروه کنترل مثبت نسبت به همه گروه ها بیشتر بود. از میان سایر تیمارها بیشترین بار آلودگی متعلق به تیمار  $L(200)$  با میانگین  $0.5 \pm 0.1 \times 10^5$  کلنی در گرم بافت و کمترین آن متعلق به تیمار  $L(600)$  با  $0.3 \pm 0.1 \times 10^4$  کلنی در گرم بافت بود. نتایج بازماندگی نشان داد، پس از گروه کنترل منفی، بیشترین درصد بقا متعلق به گروه  $G(600)$  با  $79/4 \pm 6/6$  درصد و پس از آن گروه های  $S(300)$  و  $K(600)$  با میزان به ترتیب  $73/3 \pm 7/3$  و  $70/6 \pm 6/6$  درصد بود که نسبت به گروه کنترل مثبت با درصد بقای  $33/3 \pm 6/6$  اختلاف معنی داری داشتند ( $P < 0.01$ ). این تحقیق همچنین نشان داد پارامتره ای رشد در همه گروه های تیمار که از عصاره اتانولی جلبک های مختلف با دزهای متفاوت استفاده کرده بودند نسبت به گروه کنترل مثبت بهتر بود ( $P < 0.05$ ). پس از پایان دوره پرورش ۱۰ عدد از میگوهای باقیمانده هر تکرار را پس از ضد عفونی و شستشو، با همان نام ذخیره سازی شد، شرایط پرورش و تغذیه بدون افزودن باکتری به مدت ۱۰ روز دیگر ادامه پیدا کرد. پس از این ۱۰ روز کلیه تیمارها با دز کشنده ویبریو هاروی ( $3 \times 10^8$  cfu/ml) مواجه شدند. نتایج نشان داد، همه میگوهای کنترل منفی زنده ماندند، در مقابل بیش از ۹۰ درصد کنترل مثبت تلف شدند و کلیه بچه میگو هایی که از

طریق آرتیمیای غنی‌سازی شده غلظتی از عصاره اتانولی یکی از جلبک‌های دریایی دریافت کرده بودند در مواجهه با باکتری تلفات کمتری نسبت به گروه کنترل مثبت داشتند ( $P < 0/01$ ). این مطالعه نشان داد عصاره اتانولی جلبک های منتخب از خلیج فارس برای بهبود رشد، بازماندگی و کنترل بیماری‌های میگو در مراکز تکثیر مفید است.

## فصل اول

### مقدمه و هدف

## الف- مقدمه و هدف

### الف-۱- مقدمه:

رشد روزافزون جمعیت و نیاز به تامین پروتئین مورد نیاز جوامع بشری زمینه توسعه سیستم های مختلف پرورش دام، طیور و آبزیان را فراهم نموده است. تکثیر و پرورش آبزیان و به ویژه میگو در ۳ دهه اخیر در اکثر کشورهای در حال توسعه شتاب فزاینده ای یافته است. هر چند پرورش میگو از قرنهای پیش در مقیاسهای کوچک در سواحل کشورهای شرق آسیا جایی که پرورش دهندگان، میگوها را به صورت اتفاقی و بر اساس جزر و مد در استخرهای کوچک و خوریات جمع آوری می کردند شروع شده بود، ولی اولین تخم گیری موفق و سپس پرورش تخمها به صورت مصنوعی در مقیاس تجاری در سال ۱۹۳۰ و از میگوی ماده کروما<sup>۱</sup> با تخمدان رسیده به دست آمد (Hudinaga, ۱۹۴۲). این تکنیک در سالهای بعد در دیگر کشورها و برای سایر گونه ها نیز با موفقیت اجرا و استفاده شد.

صنعت پرورش میگو در شکل و مقیاس کنونی و با مزارع پرورش توسعه یافته که ارزش اقتصادی دارند چند دهه اخیر شروع شده است. از سال ۱۹۷۰ تولید در مزارع پرورش میگو شکل تجاری و اقتصادی به خود گرفت و از اوایل دهه ۱۹۹۰ این پرورش تجاری میگو معنی دار شد و به سوددهی رسید، به طوریکه تجارت جهانی میگو در سال ۲۰۰۱ به حدود ۸ میلیارد دلار رسید

---

<sup>۱</sup> - *Marsopenaeus japonicus*

(FAO, ۲۰۰۳). هم اکنون بیش از ۶۰ کشور جهان به پرورش میگو مبادرت دارند که باعث ایجاد

شغل برای میلیون‌ها نفری شده که اغلب جزء مردم فقیر جهان هستند. در ایران نیز پرورش میگو از

اوایل دهه ۷۰ شمسی در استان بوشهر آغاز شد و هم اکنون در چهار استان جنوبی کشور و استان

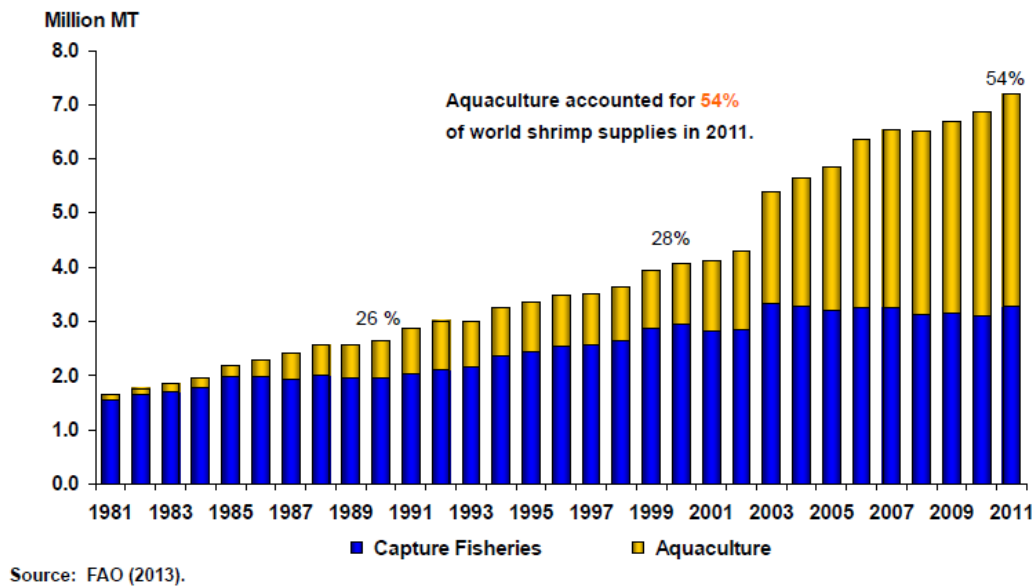
گلستان در حال انجام بوده و در مناطق تحت پوشش باعث توسعه اجتماعی اقتصادی شده است.

اگرچه داستان پرورش میگو موفقیت آمیز بوده و این موفقیت همچنان ادامه دارد به طوریکه

امروزه بیش از ۵۰٪ تولید کل میگوی جهان از مزارع پرورشی به دست می آید (نمودار ۱-۱) ولی

پرورش دهندگان میگو در دهه های اخیر متحمل زیانهای اقتصادی هنگفتی به دلیل بروز بیماریها

شده اند (Lightner, ۲۰۰۳).



نمودار ۱-۱: تولید کل میگوی جهان و مقایسه میزان تولید میگوی پرورشی در مزارع میگو با میگوی

استحصال از دریا

عامل بیشترین خسارت ناشی از بیماری‌ها ویروس‌ها بوده اند، ولی بیماری‌های باکتریایی نیز گروهی از بیماری‌های میگوها هستند که پس از ویروس‌ها در شرایط خا صی قادرند باعث تلفات سنگین در مراکز تکثیر و مزارع پرورش میگو شوند . با توسعه صنعت پرورش میگو و جایگزینی سیستم‌های متراکم به جای سیستم‌های گسترده و سستی سابق، یک محیط مستعد و مناسب جهت رشد و افزایش باکتری‌ها در مزارع پرورش میگو ایجاد شده است (Skjermo و Vadstein، ۱۹۹۹). تجمع باقیمانده های غذا، مدفوع و متابولیت‌های آنها در کف استخر یا تانک ، محیط غنی و مناسبی جهت رشد و افزایش باکتری‌ها ایجاد می کند، لذا خطر بروز بیماری‌های باکتریایی در پرورش متراکم میگو و به خصوص در مراحل لاروی که تراکم بالاست افزایش می یابد (Aguirre و Ascenico، ۲۰۰۰). از بین عوامل باکتریایی، بیشتر گونه های مختلف ویبریو عامل این خسارات ذکر شده اند (Lavilla-Pitogo، ۱۹۹۵). در دهه های ۸۰ و ۹۰ میلادی مطالعات زیادی در خصوص ویبریوزیس انجام شده و به عنوان مهمترین عامل عفونی باکتریایی در میگوها گزارش می شد (Abraham و Palaniappan، ۲۰۰۴؛ Ruangpan و همکاران، ۱۹۹۵) که می تواند خسارات اقتصادی زیادی از طرق تلفات، کاهش رشد، ایجاد ضایعات بافتی و بد شکلی در ظاهر میگو به صنعت پرورش میگو وارد کند که اثر و شدت این خسارات بسته به نوع و گونه ویبریو و همچنین شرایط آب، غذا، کیفیت و مدیریت پرورش مزرعه میگو متفاوت است (Lightner، ۲۰۰۳).

از سال ۲۰۰۹ و پس از آنکه حدود دو دهه فکر می شد مشکل اصلی بیماری‌های میگو، بیماری‌های ویروسی می باشند یک بیماری به نام مرگ زودرس میگو (EMS<sup>۱</sup>) در چند کشور مهم

---

<sup>۲</sup> Early Mortality Syndrome

تولید کننده شامل چین (سال ۲۰۰۹)، ویتنام (سال ۲۰۱۰)، مالزی (سال ۲۰۱۱) و تایلند (سال

۲۰۱۲) پدیدار شد (ناکا، ۲۰۱۱؛ Flegel، ۲۰۱۲) که باعث کاهش جهانی تولید میگو حدود ۲۵٪

در سال ۲۰۱۳ در جهان شد (نمودار ۲-۱)، بعدها معلوم شد عامل این بیماری یک باکتری به نام

ویبریو پاراهمولیتیکوس است (Tran و همکاران ۲۰۱۳).

علاوه بر این در مراکز تکثیر میگو به دلیل تراکم بالا یکی از عوامل محدود کننده رشد و

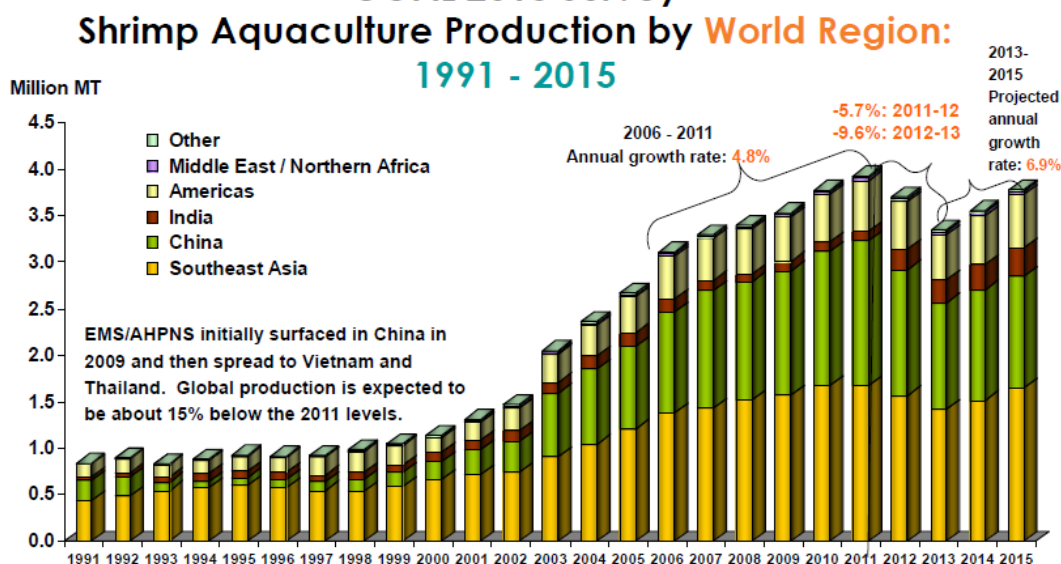
پرورش مراحل لاروی بیماریهای باکتریایی می باشند و تاکنون چندین گونه باکتری که اکثرا از

جنس ویبریوها می باشند عامل این محدودیت ذکر شده اند (Nash و همکاران، ۱۹۹۲). در جهت

پیشگیری از تلفات پست لاروها و تحریک رشد در مراکز تکثیر هم اکنون به مقدار زیادی از مواد

شیمیایی ضد عفونی کننده و آنتی بیوتیکهای وسیع الطیف استفاده می شود که باعث افزایش

مقاومت میکروبی و آلودگی محیط زیست می شود (Song و Sung، ۱۹۹۶).





نمودار ۱-۲: میزان تولید میگو تا سال ۲۰۱۱ و کاهش تولید به خاطر بروز بیماری EMS طی

سالهای ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳ و تخمین روند تولید در سالهای آینده

ادامه استفاده از آنتی بیوتیکها نیز باعث ایجاد مقاومت میکروبی و حضور آنتی بیوتیک در

بافت میگو می شود، به طوریکه هم اکنون مق اومت میکروبی در مراکز تکثیر و مزارع پرورش

آبزیان یک مشکل جهانی است که مورد توجه محققین زیادی قرار گرفته است (Tsoumas و

همکاران، ۱۹۸۹؛ Song و Sung، ۱۹۹۳؛ Mahasneh و همکاران، ۱۹۹۵؛ Herwing و همکاران،

۱۹۹۷؛ Rahim و همکاران، ۱۹۹۸) همچنین گزارش شده که سویه های درخشان از ویبریو هاروی

و ویبریو اسپندیدوس جدا شده از لاروهای میگو به برخی آنتی بیوتیکها مثل کانامایسین، پری

سیلین، استرپتومایسین و اریترومایسین مقاوم هستند (Baticados و همکاران، ۱۹۹۰). استفاده از

اکسی تتراسایکلین باعث افزایش مقاومت باکتریایی در مزارع پرورش میگو شده است (Nash و

همکاران، ۱۹۹۲). همچنین افزایش مقاومت میکروبی به کلرامفنیکل از مراکز تکثیر بسیاری از

کشورها مثل اکوادور و فیلیپین گزارش شده است (Baticados و Padihare، ۱۹۹۲). در داخل

کشور نیز مطالعه ای روی مقاومت میکروبی دو باکتری جداسازی شده از سه مرکز تکثیر تجاری

در استان بوشهر به نامهای ویبریو هاروی و ویبریو آلترینولیتیکوس انجام شده است، هرچند

*V.harveyi* جداسازی شده نسبت آنتی بیوتیکهای اکسی تتراسایکلین و تری متوپریم حساس بود

ولی هه جدایه های این باکتری نسبت به استرپتومایسین مقاومت نشان دادند . از طرفی

*V.alginoliticus* جداسازی شده از هر سه مرکز نسبت به استرپتومایسین مقاومت نشان داد و

نتایج حساسیت آنها نسبت به اریترومایسین، اکسی تتراسایکلین و تری متوپریم به ترتیب در مرکز

A، مقاوم، نیمه حساس، نیمه حساس، در مرکز B مقاوم، حساس، حساس و در مرکز C نیمه حساس، حساس و حساس بود (مقیم و همکاران، ۱۳۹۲).

در زمان استفاده از آنتی بیوتیکها در مزارع پرورشی تخمین زده می شود که به میزان ۱۵ تا ۴۰ درصد داروی استفاده شده حتی به دستگاه گوارش میگو نخواهد رسید و وارد محیط پرورش خواهد شد و قسمت دیگری نیز جذب نشده و توسط مدفوع به محیط ط بر می گردد، مقدار آنتی بیوتیکی که از این طریق به محیط بر می گردد از یک درصد (کلرامفنیکل) تا ۹۰٪ در مورد اکسی تتراسایکلین متفاوت است (Capone و همکاران، ۱۹۹۶). در مطالعه دیگری گزارش شده است که ۷۰-۹۰٪ آنتی بیوتیکهای استفاده شده در موجودات پرورشی به محیط بر می گردند که این میزان باعث فعالیت ضدباکتریایی در محیط آبی و رسوبات می شود (Hektoen و همکاران، ۱۹۹۵) و معمولاً مدت باقی ماندن این آنتی بیوتیکها بسیار طولانی است برای مثال نیمه عمر اسید اکسولینیک و اکسی تتراسایکلین حدود ۱۰۰ روز می باشد (Samuelson، ۱۹۹۲). مطالعات دیگری نیز نشان داده اند که آنتی بیوتیک ها به مدت طولانی و گاهی تا چندین ماه پس از استفاده در رسوبات و ستون آب باقی مانده اند (Matyar و همکاران، ۲۰۰۸) که این امر می تواند باعث مهار چرخه مهم میکروبی مثل باکتریهای دنیتریفیکاسیون کننده و یا مهار تولیدات اولیه استخر توسط سیانوباکترها بشود (Garcia-Armisen و همکاران، ۲۰۱۱) یا اینکه ظرفیت میکروارگانیم ها برای کاهش سولفاتها ممکن است کاهش پیدا کند (Paez-osuna و همکاران، ۲۰۰۳) که این امر نیز می تواند روی کیفیت آب و رسوبات در استخر پرورشی اثر منفی داشته باشد (Ma و همکاران، ۲۰۰۶)؛ بنابراین باقیمانده های آنتی بیوتیکی و افزایش پاتوژنها و

باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک ممکن است تولید میگوی پرورشی نیز به خطر بیندازند (Hektoen و همکاران، ۱۹۹۵؛ Capone و همکاران، ۱۹۹۶) هر چند که نگرانی وجود باقیمانده دارویی در غذاهای دریایی برای سلامت انسان مقوله ای، مهمتر است (Stolker و Brikman، ۲۰۰۵).

از طرفی دیگر، یکی از فاکتورهای تعیین کننده در موفقیت پرورش میگو ذخیره سازی لارو با کیفیت بالا می باشد. برای کاهش مشکلات بروز بیماری و رسیدن به تولید بالا و پایدار نیاز است که از پست لاروهای با کیفیت بالا ذخیره سازی شود. پست لاروهای با کیفیت بالا نه تنها باعث کاهش تلفات حین پرورش می شوند بلکه موجب رشد بهتر طی دوره پرورش می باشند و دو عامل بقا و رشد فاکتورهای مهمی هستند که مستقیماً روی تولید نهایی استخراج دارند. لذا استفاده از ترکیب غذایی که هم بتواند احتیاجات تغذیه ای پست لاروها را فراهم کند و هم باعث کاهش عفونتها و آلودگیهای باکتریایی بشود و موجب باقیمانده دارویی و مشکلات زیست محیطی و بهداشتی هم نشود برای بهبود کیفیت پست لارو و در نهایت تولید پایدار میگو بسیار مهم است. برای این مهم طی یک دهه اخیر با توجه به گرایش جهانی به طب سبز و پیرو آن آبروی پروری سبز محققین زیادی به بررسی خواص آنتی بیوتیکی گیاهان دارویی و استفاده از آنها در صنعت آبزیان پرداختند (Shangliang، ۱۹۹۰؛ Citarasu و همکاران، ۲۰۰۲)؛ و طی یک دهه اخیر با توجه به کشف مواد فعال زیستی و دارویی فراوان در جلبکهای دریایی نگاه بسیاری از محققین به این موجودات با ارزش معطوف شده است (Chiheb و همکاران، ۲۰۰۹؛ Chew و همکاران، ۲۰۰۸؛ Bansemir و همکاران، ۲۰۰۵).

## ب-اهداف تحقیق

هدف کلی از اجرای این تحقیق بررسی و شناخت برخی خصوصیات مهم و کاربردی تعدادی از جلبکهای بومی خلیج فارس و همچنین بررسی سودمندی و امکان استفاده از آنها در صنعت تکثیر و پرورش میگو به منظور همه مشکلات ذکر شده در مقدمه به خصوص حفاظت از محیط زیست و پیشگیری از مقاومت میکروبی ایجاد شده و بهبود کیفیت پست لاروهای میگو و در نهایت امکان توسعه پایدار صنعت میگو توسط برخی مواد خام و اولیه بومی، قابل دسترس و دوست دار طبیعت می باشد. اهداف جزئی این تحقیق نیز موارد ذیل می باشد:

تعیین اثرات آنتی اکسیدانی جلبکهای دریایی جداسازی شده از سواحل استان بوشهر در

شرایط آزمایشگاهی

تعیین اثرات ضد باکتریایی جلبکهای دریایی جداسازی شده از سواحل استان بوشهر در

شرایط آزمایشگاهی

تعیین اثر جلبکهای انتخاب شده بر رشد و بازماندگی بچه میگوهای سفید غربی<sup>1</sup>

تعیین اثر جلبکهای دریایی انتخاب شده در کاهش بار آلودگی باکتریایی در بچه میگوهای

سفید غربی

---

<sup>1</sup> *Litopenaeus vannamei*

تعیین اثر جلبکهای انتخاب شده در توانایی کاهش بروز بیماری ویبریوزیس در میگوی

سفید غربی

## فصل ۲

### مروری بر منابع

## الف- نگاه کلی بر جلبکهای دریایی

### الف-۱- انواع جلبکهای دریایی

در دریا سه نوع گیاه شامل فیتوپلانکتونها<sup>۱</sup> یا جلبکهای ریز<sup>۲</sup>، جلبکهای دریایی<sup>۳</sup> یا جلبکهای بزرگ<sup>۴</sup> و علفهای دریایی<sup>۵</sup> وجود دارند. فیتوپلانکتونها، میکروسکوپی بوده و به شکل آزاد و شناور در دریا وجود دارند و جزء اولین تولید کنندة های دریا محسوب می شوند . جلبکهای دریایی، ماکروسکوپی بوده که به صورت چسبنده به جایی و یا گاهی آزاد و شناور وجود دارند (Mateljan, ۲۰۰۶). این جلبکها از گیاهان اولیه هستند که فاقد ریشه، ساقه و برگ حقیقی بوده و متعلق به خانواده Thallophyta در سلسله گیاهان می باشند. جلبکهای دریایی به ۳ گروه به نامهای جلبکهای سبز<sup>۶</sup>، جلبکهای قرمز<sup>۷</sup> و جلبکهای قهوه ای<sup>۸</sup> تقسیم می شوند که این تقسیم بندی بر اساس نوع رنگدانه، شکل شناسی، آناتومی و ساختمان تولید مثلی آنها انجام شده است (ریاحی، ۱۳۷۷).

---

3-Phytoplanktons

4-Micro algae

5-Seaweeds

6-Macro algae

7-Seagrasses

8- Chlorophyta

9-Rhodophyta

10-Pheophyta

جلبکهای سبز، واقعا سبز هستند چون فاقد رنگدانه هایی هستند که رنگ سبز رنگدانه کلروفیل را بپوشاند، از نظر شکل این جلبکها بسیار متنوع می باشند، از تک سلولی، خیلی کوچک و میکروسکوپی با شنای آزاد تثبوت شده های چند لایه ای و تا درختان لوله ای بزرگ. جلبکهای قرمز علاوه بر رنگدانه کلروفیل دارای رنگدانه فوکوسیانین و فوکواریترین نیز می باشند که نمای قرمز رنگ به جلبک می دهد و در اشکال متنوع از ساده تا منشعب و رشته ای وجود دارند (کیان مهر، ۱۳۸۴). جلبکهای قهوه ای پرسلولی بوده و تقریبا در همه اکوسیستمها یافت شده از اشکال چهن تا رشته ای دارند، مثل همه فتوسنتز کننده ها دارای رنگدانه سبز کلروفیل می باشند، این گروه از جلبکها همچنین دارای رنگدانه های قهوه ای و طلایی نیز می باشند که رنگ سبز کلروفیل را می پوشانند. رنگدانه غالب در این گروه فوکوگزانتین نام دارد (ریاحی، ۱۳۷۷).

## الف-۲- شکل شناسی جلبک های دریایی

جلبکهای دریایی نیازی به ساختارهای حمایتی ندارند. همانطور که در شکل ۱-۲ نشان داده شده است، به جای ریشه، اندامی به نام نگاهدارنده<sup>۱</sup> دارند که آنها را به کف دریا یا صخره ها می چسباند. یک نگاهدارنده نیازی به گرفتن آب و سایر مواد مغذی ندارد، بلکه نیاز به یک قلاب دارد که بتواند بچسبد. ساقه در جلبکهای دریایی پایک<sup>۲</sup> نامیده می شود. پایک یک ساختار حمایتی دارد که در بین جلبکها بسیار متفاوت است، از نوع قابل انعطاف تا سفت و غیر قابل انعطاف، توپر و محکم تا توخالی و پر شده از گاز، خیلی بلند (گاهی تا ۲۰ متر) تا خیلی کوتاه و حتی ممکن است کلا وجود نداشته باشد (Davis, ۲۰۰۲). برگهای جلبکهای دریایی واقعی نیستند بلکه دارای

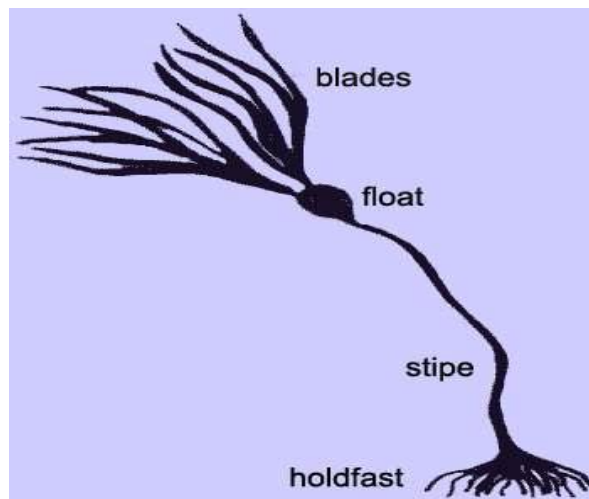
---

<sup>۱</sup> Holdfast

<sup>۲</sup> Stipe



ساختارهای شبه برگه است که Blades نامیده می شوند که عمل اصلی آنها افزایش سطح جذب نور خورشید است . در برخی گونه ها ساختار تولید مثلی نیز روی برگها قرار دارند . تعداد ساختارهای شبه برگه در برخی از جلبکها ممکن است تنها یک عدد باشد و یا اینکه به صورت منشعب و متعدد باشند.



شکل ۲- ۱: نمای کلی و اندامک های یک جلبک دریایی

بسیاری از جلبکهای دریایی واجد ساختارهای خالی<sup>۱</sup> و پرشده از گازی هستند که نماتوسیت<sup>۲</sup> نیز نامیده می شوند و روی ساختار برگ مانند یا ساقه مانند قرار دارند و موجب شناورسازی جلبک، در معرض نور قرار گرفتن و کمک به جذب بیشتر انرژی خورشید توسط ساختارهای فتوسنتزکننده می شوند (Turner, ۲۰۰۳).

<sup>۱</sup> Float

<sup>۲</sup> Pneumatocyte

### الف-۳- توزیع پراکندگی جلبک ها

فاکتورهای زیست محیطی با اهمیت ترین نقش در توزیع جلبک های دریایی ایفا می کند. قبل از هر چیز باید مقداری خاک به منظور چسبندگی موجود باشد . (سواحل شنی) بستر دائما متغیر به طور استثنایی دارای جلبک ها ی چسبیده میباشد ، به عبارت دیگر سطح خشن صخره ها و پرتگاه ها چنین زمینه مناسبی را برای چسبیدن جلبک ها فراهم می نماید.

این گیاهان در سواحل و مناطق کم عمق دریاها و اقیانوسی ها زندگی می کنند و سه نوع جامعه مجزا را می سازند که هر یک دارای خصوصیات و کاربردهای ویژه خود می باشند. این اجتماعات شامل صخره های مرجانی، مجامع سنگ، مجامع فیتوپلانکتونی می باشند.

در آب های خلیج فارس شرایط بسیار مناسبی برای پرورش جلبک ها وجود ندارد .

بررسی های انجام شده بر روی جلبک های خلیج فارس نشان میدهد که رشد جلبک در خلیج فارس ضعیف است و از سواحل به سوی داخل خلیج این رشد کمتر میشود و در دهانه خلیج فارس تعداد جلبک بیشتر است . علت فقر جلبک در خلیج فارس را باید در کمی عمق و دمای بالای آب جستجو کرد. در نزدیکی بوشهر، جلبک ها رشد خوبی دارند و دلیل آن اختلاف جزر و مد بالای ۱/۵ متر در این منطقه است . بستر خلیج فارس به علت ماسه ای و گلی بودن نیز برای رشد جلبک ها نامناسب است (سهرابی پور و سرطاوی، ۱۳۸۰). در مطالعات اکولوژیک گیاهان دریایی سواحل خلیج فارس (جزایر قشم، هرمز و لارک ) رویش نمونه های غالب جلبک های دریایی در نواحی جزر و مدی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصله نشان دهنده ی آن است که شرایط فصلی و تغییرات آب و هوایی بر تنوع و فراوانی گونه های جلبکی تاثیر گذار

است به طوریکه، در اسفند ماه انواع جلبک های سبز غالب میشوند، در بهار تراکم جلبک های قرمز نسبت به قهوه ای بیشتر است و در تابستان فراوانی با جلبکهای قهوه ای است. ولی تنوع جلبکها در فصول سرد سال (اواخر پاییز و زمستان) از بقیه فصول ماه به طور قابل ملاحظه ای بیشتر است (قرنجیک، ۱۳۸۲).

#### الف-۴-تنوع زیستی جلبکهای دریایی در سواحل خلیج فارس و دریای عمان

به طور کلی در ایران بر روی جلبکها مطالعات کمی صورت گرفته است، اما از مواردی که مطالعه شده بیشترین مورد در خصوص شناسایی و تنوع زیستی جلبکها در سواحل بوده است. برای اولین بار دایسینگ<sup>۱</sup> و اندلیچر<sup>۲</sup> (۱۸۴۵) شش گونه جلبک را در سواحل جزیره خارک شناسایی نمودند که از این تعداد چهار گونه جلبک قهوه ای و دو گونه جلبک قرمز بود (قرنجیک و همکاران، ۱۳۹۰). پس از آن یک دانشمند جلبک شناس دانمارکی<sup>۳</sup> (بورگسن)، در سواحل بوشهر، جزایر خارگ و کیش اقدام به نمونه گیری از جلبکها کرد که حاصل آن شناسایی ۱۰۳ گونه جلبک بود، از این تعداد ۲۲ گونه جلبک سبز، ۲۶ گونه جلبک قهوه ای، ۴۶ گونه جلبک قرمز و ۹ گونه جلبک سبز - آبی تشخیص داده شد (Borgesen, ۱۹۳۹). نیوتن نیز در سال ۱۹۵۵ طی دو فهرست، جلبکهای سواحل بحرین و کویت را ارائه نمود. این فهرستها شامل ۱۳ گونه جلبک سبز، ۲۶ گونه جلبک قهوه ای، ۳۰ گونه جلبک قرمز و ۱۲ گونه جلبک سبز- آبی بود (نبی پور و مراد حاصلی، ۱۳۸۰). شوقی (۱۳۷۴)، ۴۶ نمونه از سواحل استان و بلوچستان جداسازی و

---

<sup>1</sup> Diesing

<sup>2</sup> Endlicher

<sup>3</sup> Borgesen

شناسایی کرد. در یکی دیگر از مطالعات جامع در خصوص شناسایی جلبکهای سواحل خلیج فارس، ۱۵۳ گونه جلبک شناسایی شد که از این تعداد ۱۴۲ متعلق به جلبکهای سبز، قرمز و قهوه ای بود و بقیه جزء گزانتوفیتا و سیانوفیتا تشخیص داده شدند (سهرابی پور و همکاران، ۱۳۸۲). قرنچیک (۱۳۷۹) نیز اقدام به شناسایی جلبکهای سواحل استان سیستان و بلوچستان کرد که موفق شد تعداد ۸۵ گونه از همدیگر متمایز کند.

#### الف-۴- موارد استفاده جلبکهای دریایی

##### الف-۴-۱- جلبکهای دریایی به عنوان غذای انسان

از بدو پیدایش بشر تاکنون مردم برخی سواحل به خصوص در شرق آسیا این جلبکها را برداشت به عنوان غذا مصرف می کرده اند (Yoang و همکاران، ۲۰۰۶). چینی ها، ژاپنی ها، فیلیپینی ها و مردم سواحل هاوایی احتمالاً جزء اولین مردمی بودند که جلبکهای دریایی را در جیره غذایی خود گنجانند، سپس این غذاها به یک بخش مهم از جیره غذایی مردم ایسلند، اسکاتلند، سواحل اقیانوس آرام و سواحل ایالات متحده نیز تبدیل شد (Webb، ۱۹۹۷). هم اکنون در سواحل کالیفرنیا به میزان زیادی جلبک دریایی به نام کِلپ<sup>۱</sup> توسط ماشینهای بزرگ برداشت می شوند. جلبکهای دریایی در اکثر فرهنگهای کشورهای شرق آسیا به قسمت عمده ای از جیره غذایی تبدیل شده است، ۲۵ درصد غذاهای ژاپنیها حاوی جلبکهای دریایی است و چینی ها در سوپهایشان از این جلبکها استفاده می کنند (Smith، ۱۹۹۲). در بخشهای مختلف جهان بیش از یکصد نوع جلبک که عمدتاً از جلبکهای قهوه ای و قرمز هستند به عنوان غذا استفاده می شوند .

---

<sup>1</sup> Kelp

تعداد اندکی از جلبکهای سبز نیز که مواد معدنی، ویتامین، قند و پروتئین بالایی دارند، به این منظور مورد استفاده قرار می گیرند، از جلبکهای قهوه ای جنسهای *لامیناریا*، *سارگاسوم* و *آلاریا* معروفند. در آمریکای جنوبی، نوعی جلبک قهوه ای را جمع آوری کرده و پس از خشک کردن و نمک زدن، به تدریج به مصرف تغذیه می رسانند. از جلبکهای قرمز جنسهای *پورفیرا* و *کوندروس* معروفند، *پورفیرا* از مهمترین جلبکهای قرمز است که توسط انسان به عنوان غذا مورد استفاده قرار می گیرد (Mohammadi و همکاران، ۲۰۱۳). چندین مطالعه روی ارزش غذایی جلبکهای دریایی در نواحی مختلف جهان انجام شده است (Chan و همکاران، ۱۹۹۷؛ Akhtar و Sultan، ۲۰۰۲). در ایران نیز طی یک تحقیق روی ۸ گونه جلبک دریایی جداسازی شده از سواحل خلیج فارس، شامل جلبکهای سبز (یک گونه)، قهوه ای (یک گونه) و قرمز (۶ گونه) ارزش غذایی آنها مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه مشخص شد که جلبک قرمز *گراسیلاریا کورتیکاتا*<sup>۱</sup> حاوی بیشترین مقدار (۴۱/۷۲٪) و جلبک قهوه ای *کلپومنیا سینوزا*<sup>۲</sup> دارای کمترین مقدار (۱۱/۳٪) کربوهیدرات بود. پروتئین کل در یک دامنه از ۱۵/۸٪ تا ۷/۴۹٪ قرار داشت که بیشترین و کمترین آن به ترتیب مربوط به جلبکهای قرمز *Champia parvula* و *Acanthophora spicefera* بود، میزان پروتئین در جلبک سبز *کالریا سرتولاریودس*<sup>۳</sup> برابر ۱۲/۳٪ بود. مقدار چربی خام به طور کلی در جلبکهای دریایی پایین است در این مطالعه مقدار چربی خام در جلبک سبز *کالریا سرتولاریودس* و جلبک قهوه ای *کلپومنیا سینوزا* به ترتیب ۲/۸۹٪ و ۲/۹۴٪ گزارش شده است، در حالیکه بیشترین و کمترین مقدار چربی خام به ترتیب در جلبکهای قرمز *گراسیلاریا کورتیکاتا*

<sup>1</sup> *Gracillaria corticata*

<sup>2</sup> *Colpomenia sinuosa*

<sup>3</sup> *Caulerpa certularioides*

(/۵/۶) و *جانیا رابنر*<sup>۱</sup> (/۱/۸۸) ثبت شده است (Mohammadi و همکاران، ۲۰۱۳). هرچند در

ایران تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر استفاده غذایی از جلبکهای دریایی گزارش نشده است ولی مصرف آن در کشورهای امریکایی و اروپایی نیز مثل کشورهای شرق آسیا روز بروز در حال افزایش است و هر روز افراد بیشتری از سودمندی جلبکهای دریایی مطلع می شوند به طوریکه هم اکنون در ۳۱ کشور دنیا به پرورش جلبکهای دریایی در حد تجاری می پردازند . میزان تولید جهانی این جلبکها در سال ۲۰۱۰ بالغ بر ۱۹ میلیون تن و مقدار ارزش آنها به ۴/۴ میلیارد دلار رسیده است که بیش از ۹۵٪ از این مقدار از طریق پرورش حاصل می شود و حدود ۶۵٪ جلبکهای تولید شده مستقیماً به مصرف انسان می رسد (FAO, ۲۰۱۲).

#### الف-۴-۲- سایر استفاده های جلبکهای دریایی

امروزه گستره استفاده از جلبکهای دریایی به حدی رسیده است که به جرات می توان گفت جلبکهای دریایی یا متابولیتهای آنها در همه صنایع قابل استفاده می باشند. همانطور که بیان شد، قسمت اعظم این جلبکهای تولید شده در جیره غذایی انسان استفاده می شود علاوه بر آن در برخی کشورها به عنوان غذای دام و طیور استفاده می شود . تقریباً از هر ۵۰ هزار تن جلبک تر برداشت شده، حدود ۱۰ هزار تن آرد جلبک بدست می آید که ارزش دلاری آن بالغ بر ۵ میلیون دلار آمریکا می باشد . در برخی از کشورهای آسیایی مثل ژاپن، چین و برخی از کشورهای اروپایی مثل فرانسه، فنلاند، اسکاتلند و نیوزلند، از جلبکهای دریایی به ویژه جلبکهای قهوه ای برای خوراک حیوانات اهلی استفاده می کنند. در اسکاتلند، جلبکهای قهوه ای سارگاسوم، فوکوس

---

<sup>1</sup> *Jania rabens*

و لامیناریا بیشتر مورد استفاده قرار می گیرند . در فنلاند از لامیناریا و آلاریا استفاده می شود. از ماکروسیستیس نیز برای تغذیه دامهای اهلی استفاده می شود، زیرا سرشار از ویتامین A و E است (کیان مهر، ۱۳۸۴). استفاده از جلبکها به عنوان علوفه تا ۱۰٪ تولید شیر را بدون اینکه هیچ تغییری در مزه و طعم آن ایجاد نماید افزایش داده و باعث افزایش مقدار چربی و کره شیر می گردد.

استفاده از جلبک ها بعنوان کود در کشاورزی نیز گزارش شده است (کیان مهر، ۱۳۸۴). جلبکها ب خاطر دارا بودن مقدار فیبر بالا باعث نرم کردن بافت خاک و حفظ رطوبت آن و از طرفی ب خاطر دارا بودن مواد معدنی و عناصر کمیاب موجب غنی سازی خاک می شوند . مطالعات مختلف علمی ثابت کرده است که کارایی این محصولات (فرآورده ها) بطور گسترده ای در صنعت باغبانی مورد استقبال قرار گرفته است، بطوریکه بعد از استفاد ه از این فرآورده ها، افزایش محصول، افزایش جذب مواد غذایی خاک، افزایش مقاومت به آفات خاص، افزایش جوانه زنی بذر و مقاومت در مقابل یخ زدگی را در پی داشته است. به هر حال از زمان پی بردن به چنین خواص کارآمدی در جلبک ها، به نظر می رسد با توجه به پیشرفت کشاورزی و آبرزی پروری ارگانیک، بازار روبه رشد فزاینده ای داشته باشد . در انگلستان از جلبکها بعنوان کود برای محصولات چو ن سیب زمینی، کلم و سبزیجات استفاده می شود . همچنین گزارش شده است که دادن کود جلبکی به مزارع سیب زمینی باعث می شود قدرت مقابله این گیاه در مقابل بیمار ی قارچی افزایش یافته و نسبت به بیماریهای ویروسی چون پیچ خوردگی برگ مقاومت پیدا کنند . در مورد گوجه فرنگی دادن کود جلبکی سبب افزایش دوره میوه دهی گوجه فرنگی شده و زمین را از وجود شته ها عاری می سازد (Dawes، ۱۹۸۰).

مهمترین مورد استفاده جلبکها پس از غذای انسان استفاده در صنعت می باشد. بیشترین

دلیل استفاده جلبکها در صنعت وجود مقدار قابل توجه ترکیبات پلی ساکاریدی نظیر آگار،

الژینات، کاراگینان و ... در دیواره جلبکها است (Bilan و همکاران، ۲۰۰۷). به طور کلی

فیکوکلونیدها یا کلونیدهای جلبکی مهمترین محصول تجاری مشتق شده از جلبکها هستند. این

مواد از دیواره سلولی جلبکها بدست آمده و به جهت اینکه قابلیت تبدیل از حالت مایع (Sol) به

جامد (Gel) دارند، مفید می باشند، هیدروکلونیدها مواد غیر کریستال با مولکولهای بزرگی می

باشند که در آب حل شده و حالت محلول چسبنده<sup>۱</sup> ایجاد می کنند (Wantanabe و همکاران،

۱۹۹۹).

الژینات که از جلبکهای قهوه ای به خصوص کلپها (آسکوفیلوم، لامیناریا و

ماکروسیستیس) به دست می آید به علت کاهش تولید کریستال هنگام یخ زدن و یکنواخت کردن

بافت آن در بستنی سازی، در کرمهای آرایش به عنوان نرم کننده، در شربتها به عنوان امولسیون

کننده و همچنین در صنعت شکلات سازی استفاده دارد (Kaladharan و همکاران، ۱۹۹۸).

آگار که از جلبکهای قرمز به خصوص جنسهای ژیلیدیوم<sup>۲</sup> و گراسیلاریا تولید می شود،

بیشترین مصرف در مطالعات باکتری شناسی به عنوان محیط کشت دارد ولی در صنایع گوشت،

ماهی کنسرو شده و تهیه کلوچه های گوشتی هم مصرف دارد (قرنجیک، ۱۳۸۰).

---

<sup>۱</sup> Viscous slouble

<sup>۲</sup> Gelidium



## ب-مروری بر فعالیتهای بیولوژیک عصاره های جلبکی

### ب-۱- فعالیتهای ضدباکتریایی جلبکهای دریایی

فعالیت ضدباکتریایی جلبکهای دریایی در اکثر مناطق ساحلی جهان و علیه بسیاری از باکتریهای پاتوژن و غیر پاتوژن بررسی شده است که در ادامه به برخی از این مطالعات اشاره می شود.

از اولین و گسترده ترین کارهای پایش جهت خواص ضدباکتریایی جلبکها، مطالعه ای است که در سواحل انگلستان انجام شده است (Hornesy و Hide، ۱۹۷۴)، عصاره خام ۱۵۱ گونه از جلبکهای دریایی برای اثبات خواص ضدباکتریایی م ورد بررسی قرار گرفت که از این مطالعه نتایج مهم و امیدوار کننده ای برای مطالعات بعدی گرفته شد . اکثر گونه های جلبکهای قرمز فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتریهای نظیر *Bacillus subtilis*، *E.coli*، *S.aureus* و جنس پروتئوس داشتند. در این مطالعه مشخص شد ۱۲ جنس از جلبکه ای قهوه ای مورد بررسی و تعداد زیادی از جلبکهای سبز نیز اثرات مشابه ضدباکتریایی دارند.

با توجه به نتایج مثبت و تاثیرات مفید جلبکهای دریایی علیه باکتریهای مختلف، این گونه مطالعات در سایر مناطق جهان هم ادامه پیدا کرد، از جمله در هندوستان (Parekh و Rao، ۱۹۸۱) دریافتند که عصاره خام جلبکهای سبز (کالریا، انتروموبا و هالیمدا)، قرمز (گراسیلاریا، ژیلیدلا و لورنسیا) و قهوه ای (پادینا، دیکتیوتا) دارای اثرات بیولوژیکی قوی بر میکروارگانسیم ها می باشند.

خواص ضد میکروبی ۳۵ جلبک دریایی نمونه برداری شده از سواحل سری لانکا نیز بررسی شده است (Bandara و همکاران، ۱۹۸۸). نتایج این بررسی نشان داد که ۲۶ گونه از جلبکهای مورد بررسی دارای فعالیت ضدباکتریایی و ضد قارچی بودند.

در مطالعه دیگری روی ۳۰ گونه جلبک جمع آوری شده از سواحل اقیانوس هند در منطقه تامیل نادو<sup>۱</sup> نشان داد که عصاره های به دست آمده از گونه های Enteromorpha *Gracilaria corticata* و *Padina gymnospora*، *Sargassum wightii*، *compressa* اثرات قوی ضدباکتریایی علیه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی داشت (Rao و همکاران، ۱۹۹۱).

اثرات ضد میکروبی جلبکهای سواحل ترکیه نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Tuney و همکاران، ۲۰۰۶). در این بررسی ۶ عصاره حاصل از حلالهای مختلف از ۱۱ گونه جلبک دریایی علیه باکتریها و قارچ های بیماریزای انسانی مورد بررسی قرار گرفت . نتایج بررسی نشان داد عصاره های مختلف هر جلبک دارای فعالیتهای ضد میکروبی متفاوتی از بی اثر تا قوی دارند.

اثرات ضدباکتریایی عصاره های خام متانولی به دست آمده از ۳۲ جلبک پرسلولی (۱۳ جلبک سبز و ۱۹ جلبک قهوه ای) جمع آوری شده از سواحل مدیترانه در حاشیه کشور مراکش هم مورد بررسی قرار گرفته است . نتایج این تحقیق نیز نشان داد بسیاری از عصاره ها دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه پاتوژنهای انسانی نظیر *Enterococcus faecalis*، *S.aureus*، *E.coli* می باشند (Chiheb و همکاران، ۲۰۰۹).

<sup>1</sup> Tamil Nadu

۷۱ گونه از جلبکهای دریایی سواحل مرکزی مدیترانه به منظور ارزیابی وجود پتانسیل

ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی، سمیت برای سلولها (سیتوتوکسیستی)<sup>۱</sup> و ضد میتوزی بررسی شدند (Ballesteros و همکاران، ۱۹۹۲). نتایج نشان داد، ۵۶ گونه از جلبکها انواع مختلف فعالیتها را از خود نشان دادند و اکثرا علیه همه پاتوژنها و سلولهای تست شده فعال بودند. در کل فعالیت ضدقارچی در ۷۰ درصد موارد دیده شد ولی فعالیت ضدباکتریایی فقط در شش درصد موارد وجود داشت، ۲۱٪ جلبکها دارای فعالیت ضد ویروسهای مورد آزمون بودند، ۳۵٪ فعالیت سیتوتوکسیستی داشتند و نزدیک به ۵۰٪ جلبکها پتانسیل ضد میتوزی (ضد سرطانی) داشتند.

پتانسیل ضد میکروبی شش جلبک سبز از سواحل کشور تانزانیا نیز علیه سه باکتری پاتوژن انسانی، یک مخمر و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* مورد ارزیابی قرار گرفت (Mtolera و Semesi، ۱۹۹۶). عصاره جلبک *Valonia aerophila* بیشترین فعالیت علیه همه پاتوژنهای تست شده داشت و سایر عصاره ها فعالیت بیشتری علیه باکتریها نسبت به پنی سیلین G داشتند.

بررسی اثرات ضدباکتریایی جلبکهای دریایی جداسازی شده از سواحل کراچی کشور پاکستان نیز حاکی از وجود پتانسیل ضدباکتریایی در این جلبکها داشت (Rizvi، ۲۰۱۰).

خواص و فعالیت ضد میکروبی جلبکهای جداسازی شده از سواحل خلیج فارس تنها در چند مطالعه کوتاه بررسی شده است، در مطالعه ای مشخص شد عصاره آبی جلبک قهوه ای *Cystoseria myrica* به دست آمده از سواحل استان بوشهر در حاشیه خلیج فارس علیه هرپس ویروس موثر است (Zandi و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین اثرات ضدباکتریایی عصاره های دو

---

<sup>1</sup> Cytotoxicity

جلبک قرمز (لورنسیا) و قهوه ای (سارگاسوم) بدست آمده از سواحل شهر بوشهر واقع در حاشیه خلیج فلوس علیه پاتوژنهای انسانی مورد بررسی قرار گرفته است (درخشش و همکاران، ۱۳۹۰). نتایج این مطالعه حاکی از موثر بودن عصاره مذکور بر بازدارندگی رشد باکتریهای مورد آزمون داشت. در مطالعه دیگری نیز اثرات عصاره هیدروالکلی سه جلبک سبز (*E.intestinalis*)، قرمز (*G.corticata*) و قهوه ای (*C.myrica*) جمع آوری شده از سواحل شهر بوشهر بر باکتریهای لیستریا منوسیتوژن و اشریشیا کولی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آزمون بیان کرد هیچ کدام از عصاره های مذکور اثر بازدارندگی بر باکتریهای مورد آزمایش نداشته اند (حیدری و همکاران، ۱۳۹۲)؛ اما م مطالعه دیگری نشان داد که عصاره های کلروفرمی و اتانولی جلبک سارگاسوم لاتیفولیوم نمونه برداری شده از سواحل خلیج فارس دارای اثرات ضدباکتریایی موثری بر باکتریهای جنس ویبریو جداسازی شده از میگوهای پرورشی می باشد (Dashtiannasab و همکاران، ۲۰۱۲)

## ب-۲- فعالیت آنتی اکسیدانی جلبکهای دریایی

گونه های مختلف اکسیژن واکنشگر (ROS)<sup>۱</sup> از قبیل رادیکالهای سوپراکساید ( $O_2^{\bullet}$ )، هیدروکسیل (OH) و پراکسیل (ROOH) طی متابولیسم های بدن مدام در حال تولید می باشند. امروزه نقش عمده این رادیکالها در بروز استرس اکسیداتیو و پیشرفت بیماریهای صعب العلاج به خوبی روشن شده است (جمشیدی و همکاران، ۱۳۸۹). همچنین نقش اکسیژن واکنشگر در پراکسیداسیون چربیها نیز مشخص شده است که از این طریق باعث تخریب غذاها و رشد

<sup>۱</sup> Reactive Oxygen Species

میکروارگانسیم ها در غذا می شوند (مصحفی و همکاران، ۱۳۸۵). امروزه به منظور حل این دو معضل از آنتی اکسیدانها استفاده می شود.

آنتی اکسیدان به ترکیباتی اطلاق می شود که به طور موثر و از طرق مختلف از واکنش رادیکالهای آزاد اکسیژن، نیتروژن فعال و یا بیومولکولهای نظیر پروتئین، اسید آمینه، لیپید و DNA جلوگیری کرده و منجر به کاهش آسیب و مرگ سلولها می شود (عیوقی و همکاران، ۱۳۸۸). آنتی اکسیدانها به دو دسته شیمیایی و طبیعی تقسیم می شوند که هم اکنون از دسته اول بیشترین استفاده می شود که روشن شده است دارای مضرات فراوانی برای سلولهای زنده است (Kahl و Kappus، ۱۹۹۳)، لذا تلاشها برای استفاده از آنتی اکسیدانهای طبیعی معطوف شده است.

گیاهان منبع غنی از ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و تانن ها هستند که مهمترین آنتی اکسیدان های طبیعی به شمار می روند. در چند دهه اخیر دیده شده جلبکهای دریایی که از دیرباز در جوامع مختلف بشری مصرف می شده اند نیز دارای ترکیبات آنتی اکسیدان می باشند، ل ذا تحقیقات گسترده ای در تمام نقاط جهان برای این منظور انجام شده است که در ادامه اشاره می گردد.

در یک مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی ۲۷ گونه جلبک دریایی نمونه برداری شده از سواحل کشور چین مورد ارزیابی قرار گرفت (Hou، ۲۰۰۰). از میان جلبکهای مورد بررسی ۱۵ گونه دارای فعالیت آنتی اکسیدانی معنی دار حداقل در یک حلال آلی بود که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی برای جلبک *Gloiosphonia capliiries* ثبت شده است.

در یک مطالعه دیگر چند گونه جلبک دریایی از لحاظ فعالیت آنتی اکسیدانی بررسی شده اند، نتایج نشان داد جلبکهای سبز و قرمز دارای اثرات بازدارندگی بیشتری در بروز سرطان روده، پوست و پستان جوندگان دارند (Yuan و همکاران، ۲۰۰۵).

Kumar و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت آنتی اکسیدانی سه گونه جلبک به نامهای *G. edulis*، *Euchema kappaphycus* و *Acanthopthera spicifera* جمع آوری شده از سواحل هندوستان را بررسی کردند، در گزارش ایشان آمده است که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی جلبکها دارای بیشترین میزان فنل بوده است.

پتانسیل آنتی اکسیدانی عصاره های آنزیمی ۷ گونه از جلبکهای قهوه ای نیز در مقایسه با آنتی اکسیدانهای تجاری ارزیابی شده است (Soon Jin و همکاران، ۲۰۰۵). در این مطالعه معلوم شد عصاره های آنزیمی جلبکها دارای فعالیت قوی (بیش از ۹۰٪) در برداشت رادیکالهای آزاد پراکسید هیدروژن می باشند و حتی در برخی موارد نتایج از آنتی اکسیدانهای تجاری نیز بهتر بود.

فعالیت آنتی اکسیدانی جلبکهای خوراکی سواحل ایرلند نیز بر رسی شده است (Cox و همکاران، ۲۰۱۰). در این مطالعه مشخص شد عصاره خشک متانولی در بین سایر عصاره ها به طور معنی داری دارای میزان ترکیبات فنلی و همچنین فعالیت بیشتری برای برداشت رادیکال آزاد مولکول DPPH می باشد به طوریکه غلظت برداشت ۵۰٪ رادیکال آزاد ( $EC_{50}$ ) عصاره متانولی ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بود.

خواص عصاره های مختلف جلبکهای قهوه ای و قرمز سواحل هندوستان برای حذف رادیکالهای آزاد مورد بررسی قرار گرفته است . در این مطالعه مشخص شد عصاره متانولی جلبکهای قهوه ای اثرات بهتری در حذف رادیکالهای آزاد دارند (Sachindra و همکاران، ۲۰۱۰).

در سواحل خلیج فارس مطالعات انگشت شماری روی جلبکهای دریایی و همچنین اثرات آنتی اکسیدانی آنها شده است . در یک مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های آبی و اتانولی یک جلبک قهوه ای *S. boveanum* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر مورد بررسی قرار گرفت (Rastian و همکاران، ۲۰۰۷). این مطالعه نشان داد هر دو عصاره اثرات آنتی اکسیدانی قابل توجهی نسبت به کنترل دارند، همچنین نتایج تحقیق نشان داد عصاره آبی اثرات آنتی اکسیدانی قوی تری نسبت به عصاره اتانولی دارد . همچنین در یک مطالعه دیگر اثرات آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی سه جلبک سبز (*E.intestinalis*)، قرمز (*G.corticata*) و قهوه ای (*C.myrica*) نمونه برداری شده از سواحل شهر بوشهر مورد بررسی قرار گرفته است (حیدری و همکاران، ۱۳۹۲). نتایج این تحقیق نشان داد بیشترین مقدار فنل تام و بهترین فعالیت ضد اکسیدانی با آزمون پتانسیل آنتی اکسیدانی معادل ترولکس متعلق به جلبک سبز و کمترین این مقادیر مربوط به عصاره هیدروالکلی جلبک قرمز بود، البته اختلافها از نظر آماری معنی دار نبوده اند . در یک بررسی نیز از عصاره آبی جلبک قهوه ای *S.angustifolium* جداسازی شده از سواحل استان بوشهر به عنوان آنتی اکسیدان در نگهداری گوشت چرخ شده ماهی کیلکای معمولی در یخچال انجام شده است (باباخانی لشکان و همکاران، ۱۳۹۲) که پس از استفاده آنالیز میزان پراکسید، اسیدهای چرب آزاد، تیوباریتوریک اسید و ترکیب اسیدهای چرب نمونه ها نشان داد که نمونه

های حاوی عصاره جلبکی با غلظت ۳۰۰ پی پی ام قادر است فساد اکسیداسیونی کمتری نسبت به سایر تیمارها ایجاد کند.

### ج- کاربرد جلبکهای دریایی در آبی پروری

جلبکهای دریایی یکی از محصولات مهم تجاری در جهان هستند که قرن‌ها است به دلیل داشتن کاروتنوئیدها، فیبرهای غذایی، پروتیین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین‌ها و مواد معدنی در جیره غذایی مردم شرق آسیا استفاده شده است (Norzian و Ching, ۲۰۰۰). بر همین اساس و با توجه به کشف مواد بیولوژیک فعال جدیدتری در این جلبکها، اخیراً علاوه بر تغذیه به منظورهای متنوع دیگری نیز، این موجودات گرانبها به روش‌های مختلفی در آبی پروری مورد استفاده قرار گرفته‌اند که به برخی از آنها اشاره می‌شود. البته در این جا سعی می‌شود روی میگو فوکوس شود اما گاهی رفرنسهایی در خصوص سایر گونه‌های آبی هم ذکر شده است.

از برخی جلبکهای پرسلولی مثل *Macrocytis pyrifera* (معروف به کَلپ)، *Sargassum spp.*, *Gracilaria*, *Kappaphycus alvarezii*, *Ascophyllum nodosum* و *heteroclada* در غذای میگو استفاده شده است و عملکرد آنها در جیره مورد ارزیابی واقع شده است (Golez و Penafiorida, ۱۹۹۶)؛

در مطالعه‌ای (Da Silva و Barbosa, ۲۰۰۹) از پودر جلبک دو گونه جلبک دریایی در برزیل به عنوان منبع پروتیین در غذای میگوی میگوی وانامی استفاده کرده‌اند. قبل از آن هم از پودر جلبک *Laminaria digitata* به عنوان بخشی از جیره غذایی میگوی وانامی استفاده شده بود (Lawrence و He, ۱۹۹۳).



چندین جلبک دریایی پرسلولی همچنین در جیره غذای برخی از ماهیان پرورشی مورد

استفاده قرار گرفته و اثرات مختلف آنها مورد ارزیابی قرار گرفته است (Nakagava و

Montgomery, ۲۰۰۷).

در چندین تحقیق گزارش شده که پودر جلبکها می تواند به عنوان همبند در جیره غذایی

آبزیان عمل کند (Briggs و Funge-Smith, ۱۹۹۶؛ Cruz-suarez و همکاران, ۲۰۰۸). اکثر نتایج

نشان داده اند که استفاده از جلبکهای دریایی در فرمول جیره آبزیان باعث بهبود کیفیت پلت شامل

نگهداری آب، بهبود ظرفیت نگهداری آب و همچنین بهبود کیفیت پلت می گردد و از این طریق

باعث بهبود تاثیر جیره می گردند برای مثال در مطالعه ای جایگزینی آرد سویا و آرد گندم توسط

درصدهای مختلف (۰-۳۰٪) توسط پودر جلبک قرمز گراسیلا ریا بررسی شده، نتایج نشان داده که

فاکتور ماندگاری در آب غذای تیمار حاوی تا ۱۰٪ پودر جلبک تفاوت معنی داری با گروه کنترل

(غذای تجاری) طی ۱۲ ساعت نداشته است و جیره های بیش از ۱۵٪ به میزان ۸۸٪ آب در خود

نگهداری کرده بود (Briggs و Funge-Smith, ۱۹۹۶). مطالعات دیگری نیز در این خصوص

انجام شده است که اکثرا نتایج مناسبی داشته اند (Marinho-Soriano و همکاران, ۲۰۰۷). خواص

بایندری (همبندی) جلبکها و همچنین ظرفیت بالای آنها در جذب آب را به خواص ژلاتینه شدن

آنها و میزان آلژینات موجود در آنها ربط می دهند (Kuda و همکاران, ۱۹۹۷).

از جلبک قهوه ای *Cladosiphon okamuranus* یک پلی ساکارید سولفات به نام

فوکوئیدان استخراج شده (Itami و همکاران, ۲۰۰۲) که از آن در غذای میگوی ژاپنی به منظور

بهبود سیستم ایمنی میگو در برابر WSSV استفاده شده است.

بر اساس یک گزارش دیگر استفاده خوراکی فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه ای *Sargassum polycystum* در غذای میگو های ۵-۸ گرمی و ۱۲-۱۵ گرمی می تواند سبب کاهش اثر WSSV بر میگوی ببری سیاه<sup>۱</sup> گردد (Chotigeat و همکاران، ۲۰۰۴). آنها همچنین مشاهده کردند که فوکوئیدان بر باکتری های ویبریو هاروی، استافیلوکوکوس ارئوس و اشیریشیا کلی نیز اثر بازدارندگی دارد.

در مطالعه ای از آلژینات سدیم جداسازی شده از جلبکهای دریایی به میزان ۲ گرم بر کیلوگرم به منظور تحریک سیستم ایمنی میگوی وانامی در برابر عفونت حاصله بر اثر *Vibrio alginolyticus* بررسی شده است (Cheng و همکاران، ۲۰۰۵).

از عصاره اتانولی *Sargassum fusiforme* اضافه شده به غذای میگوی چینی<sup>۲</sup> نیز به منظور تحریک سیستم ایمنی و مقاومت میگوها در برابر بیماری ویبریوزیس استفاده شده است (Huang و همکاران، ۲۰۰۶).

در یک مطالعه در مکزیک دیده شده استفاده از عصاره آبی جلبک *M. Pyrifera* به صورت تزریقی روی افزایش تعداد هموسیت های میگوی وانامی و تحریک سیستم ایمنی در برابر آلودگی باکتریایی *V. campbellii* موثر واقع شده است (Sanchez و همکاران، ۲۰۱۴).

اخیرا چندین مطالعه در خصوص کشت توام جلبکهای دریایی با سایر آبزیان به منظورهای مختلف شامل تغذیه، بهبود کیفیت آب، پیشگیری و کنترل بیماریها و غیره انجام شده

---

<sup>۱</sup> *Penaeus monodon*

<sup>۲</sup> *F. chinensis*

است (Porchas-Corenjo و همکاران، ۱۹۹۹؛ Neori و همکاران، ۲۰۰۴؛ Lombardi و همکاران، ۲۰۰۶).

## د-غنی سازی آرتمیا

استفاده از آرتمیا از سال ۱۹۳۰ زمانی که محققان آن را یک غذای عالی جهت تغذیه لاروهای تازه تفریخ شده معرفی نمودند آغاز گردید . امروزه استفاده از اشکال متنوع آرتمیا از جمله تخم مقاوم (سیست)، تخم پوسته زدایی شده، نوزاد (ناپلیوس)، آرتمیای بالغ، آرتمیای منجمد و خشک شده در پرورش لارو میگو و ماهیان پرورشی رایج است . آرتمیا از بی مهرگان نادری است که در برابر شوریهای مختلف تطابق بالایی دارد و به طور وسیع در جهان انتشار دارد (Larger و همکاران، ۱۹۸۶). آرتمیا از نظر تغذیه یک پالایشگر غیر انتخابی است ، تخم آرتمیا پس از شکوفایی، وقتی با پوست اندازی به دومین مرحله ناپلی (اینستار ۲) می رسد (یعنی حدود ۸ ساعت بعد تخم گشایی ) شروع به فیلتر کردن ذرات کوچکتر از ۵۰ میکرومتر صرف نظر از ماهیت آنها می کند . از طرفی ناپلی آرتمیا به عنوان بهترین غذای زنده قابل دسترس به طور وسیعی در پرورش لارو ماهیان دریایی و سخت پوستان در تمام نقاط جهان مورد استفاده قرار می گیرد (Lavens و Sorgelous، ۱۹۸۶). با توجه به این دو موضوع امروزه از آرتمیا تحت فرایند غنی سازی برای رساندن مواد مختلفی از قبیل مواد مغذی شامل ویتامینها، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب بلند زنجیره غیره اشباع و غیره یا سایر موارد مثل داروها، واکسن ها، پروبیوتیک ها، هورمون ها، رنگدانه ها مورد استفاده قرار می گیرند (Lepeage و Roy، ۱۹۸۴). این عمل به منظور انتقال این ترکیبات به جانور شکارچی و بهبود کیفیت لارو، افزایش بازماندگی و مقاومت

آن در برابر تنش های محیطی و ب بیماریهای مختلف انجام می شود (Roy و Lepeage، ۱۹۸۴؛ Bell و همکاران، ۲۰۰۱). در این قسمت به چندین مطالعه جدید شبیه به مطالعه ما اشاره می گردد.

در یک مطالعه، ناپلی آرتمیا توسط دو محصول از گیاهان دارویی به نامهای Stressol یک و دو غنی سازی شده و به میگوی سفید هند<sup>۱</sup> خورانده شد و تاثیر آن روی رشد میگوها و مقاومت در برابر استرس شوری بررسی شده است (Chitra، ۱۹۹۵).

چندین مطالعه روی آرتمیای غنی سازی شده با گیاهان دارویی و خوراندن آنها در مرحله پست لاروی میگوها به منظورهای متفاوت از جمله بهبود کیفیت لاروها (Citarasu و همکاران، ۲۰۰۲)، کنترل پاتوژنهای باکتریایی در هچری (Citarasu و همکاران، ۲۰۰۱) و تحریک سیستم ایمنی به منظور پیشگیری در برابر بیماری ویروسی لکه سفید (WSD)<sup>۲</sup> انجام شده است (Citarasu و همکاران، ۲۰۰۶).

از آرتمیای غنی سازی شده با عصاره متانولی چند گونه گیاه دارویی، به منظور کاهش بار آلودگی باکتریایی در مرحله پست لاروی میگوی منودون استفاده شده است (Citarasu و همکاران، ۲۰۰۳).

Babu و همکارانش (۲۰۰۸) از آرتمیای غنی سازی شده به وسیله دو گونه گیاه دارویی به نامهای علمی *Withania somnifera* و *Mucuna pruriens* به منظور بررسی وضعیت تولید

---

<sup>۱</sup> Fenneropennaeus indicus

<sup>۲</sup> White Spot Disease

تخم، شکوفایی تخم ها، کیفیت لاروهای به دست آمده در گروههای تیمار و مقایسه آنها با گروه شاهد مطالعه شده است.

از عصاره های چند گیاه دارویی و دو جلبک دریایی به نامهای *Sargassum wightii* و *Ulva lactuca* در غنی سازی آرتمیا استفاده شده و سپس از آرتمیای غنی سازی شده در تغذیه بچه میگوهای سفید هندی مورد استفاده قرار گرفته است و اثرات آن در بهبود رشد و بازماندگی و کاهش بار آلودگی باکتریایی بررسی شده است.

از یک محصول گیاهی به نام Livol نیز که محصولی طبیعی از تعدادی گیاه دارویی است در غنی سازی آرتمیا استفاده شد و آرتمیای غنی سازی شده به منظور بهبود هضم مواد غذایی و بهتر شدن وضعیت رشد مراحل لاروی ماهیان مختلف مورد استفاده قرار گرفته است

(Uinkrishnan, ۱۹۹۵؛ Jayaprakas و Euphrasia, ۱۹۹۶).

## فصل سوم

### مواد و روشها

## الف- مواد و روش کار

### الف-۱- وسایل و مواد مورد نیاز

#### الف-۱-۱- مواد مورد نیاز جهت بررسی فعالیت آنتی باکتریایی

محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA)<sup>۱</sup>، تریپتیک سوی براث (TSB)<sup>۲</sup>، مولر هیتون

آگار (MHA)<sup>۳</sup>، مولر هیتون براث (MHB)<sup>۴</sup>، تیوسولفات سیترات بایل سوکروز آگار (TCBS)<sup>۵</sup>

(کلیه محیط های کشت محصول شرکت مرک - آلمان)، انفلو، متانول، کلروفرم، نمک سدیم

کلراید، سوآپ، پلیت پلاستیکی استریل، پنبه، آب مقطر، آب دیونیزه، میکروتیوب، فویل

آلومینیومی، آمپول لیوفلیزه گونه های باکتری (سازمان پژوهشهای صنعتی قارچ و باکتری ایران)

---

<sup>1</sup> Tryptic Soy Agar

<sup>2</sup> Tryptic Soy Broth

<sup>3</sup> Muler Hinton Agar

<sup>4</sup> Muler Hinton Broth

<sup>5</sup> Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar

## الف-۱-۲- مواد مورد نیاز جهت بررسی اثرات آنتی اکسیدانی

ویتامین C، پودر DPPH (محصول شرکت سیگما کشور ایالات متحده)، حلالهای اتانول، متانول، کلروفرم (هر سه ساخت شرکت مرک آلمان)

## الف-۱-۳- مواد مورد نیاز جهت بررسی فعالیتهای رشد و بقای بچه میگو و چالش با باکتری

غذای میگو (غذای تجاری از شرکت هووراش، بوشهر، ایران - سایز ۰/۱ و ۰/۲ میلی متر)، سیستم آرتمیا (شرکت INVE, Belgium)، باکتری ویبریو هاروه ای (PTCC ۱۷۵۵)، آب دریایی فیلتر شده

## الف-۲- تجهیزات و وسایل مورد نیاز

تجهیزات نمونه برداری، آماده سازی و عصاره گیری از جلبکها (قایق صیادی، چنگک، چاقو، دستگاه سوکسله، دستگاه تبخیر کننده چرخان<sup>۱</sup>، بشر، ویال، لوله آزمایش، پتریدیش و سایر ظروف شیشه ای)، تجهیزات نگهداری میگو (تانک های نگهداری میگو و آب، آکواریوم های پلاستیکی، دستگاه های هواده، سنگ هوا، سرب)، تجهیزات مورد نیاز جهت شکوفایی و غنی سازی آرتمیا (مخازن مخروطی شکل، ظروف پلاستیکی، سنگ و شلنگ هوا، لوپ، میکروسکوپ) یخچال ۴ درجه سانتی گراد و فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد (یخساران، ایران)، ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم، حمام آب یا بن ماری (Julabo، آلمان)، تجهیزات مورد نیاز جهت تستهای باکتری شناسی و سنجش اثرات آنتی اکسیدان جلبکها (دستگاه انکوباتور یخچال دار مدل JSBI-250C, JSR Korea، دستگاه انکوباتور شیکر دار مدل JSS-200-CL JSR Inc.

---

<sup>۱</sup>. Rotary



Korea, دستگاه کولیس دیجیتال مدل GB/T14899-94, دستگاه سانتیفریوژ یخچال دار مدل 3-  
16PK, Sigma Inc, کولیس دیجیتال مدل Guanglu, China, دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل  
Uv-Vis Spectrophotometer 6800 Jenway Inc, England, اتوکلاو مدل Astell, انگلستان,  
ارلن، بشر، لوله آزمایش، راک، سر سمپلر زرد، پوار، توری و سه پایه، نیدل، پیپت، لوله آزمایش،  
پنس، لوپ سیمی، محلول استاندارد مک فارلند، لوله فالکن، ظروف شیشه ای درب دار، مگنت)

## ب- روش کار

### ب-۱- تهیه و آماده سازی جلبکها

#### ب-۱-۱- نمونه برداری و شناسایی جلبکها

در فلصاع زمانی ماههای آذر و اسفند از مناطق بین جزر و مدی و یا پایین جزر و مدی  
سواحل استان بوشهر و به طور خاص مناطق بندرگاه، ریشهر، کنار اسکله های جلالی و جفره،  
پارک دانشجو، پارک ساحلی مرجان اقدام به جمع آوری دستی جلبکهای پرسلولی تازه از دریا  
شد، یا با رفتن به وسیله قایق به منطقه علفدون واقع در مجاورت جزایر شیف و عباسک توسط  
چنگک تعدادی دیگر از گونه های جلبکی جمع آوری شدند (شکلهای ۱-۳ و ۲-۳). مناطق جمع  
آوری گونه های مختلف در جدول ۱-۳ به همراه مختصات جغرافیایی آنها آورده شده است.



شکل ۳-۱: جمع آوری جلبکها به وسیله چنگک



شکل ۳-۲: جمع آوری جلبکهای دریایی در منطقه بین جزر و مدی به وسیله دست

پس از جمع آوری و حمل آنها به آزمایشگاه، قسمت‌های نکرده جلبکها جداسازی و توسط آب شیرین به خوبی چندبار شستشو شدند تا گل و لای و موجودات اپی فیت آنها کاملاً تمیز شود (تصاویر ۳-۳ و ۳-۴)، پس از تمیز شدن کامل جلبکها، با پهن کردن آنها در محوطه آزمایشگاه به مدت ۱۰ روز مبادرت به خشک کردن آنها شد در ضمن قبل از خشک شدن نمونه هایی از هر جلبک برای شناسایی در فرمالین ۵٪ نگهداری شد (قرنجیک و همکاران، ۱۳۹۰). به منظور شناسایی جلبکهای جمع آوری شده از رفرنسهای معتبر (قرنجیک و روحانی ۱۳۸۹؛

Borgesen, ۱۹۳۹؛) و کمک کارشناسان مرکز تحقیقات آبهای دور (چابهار) و مرکز تحقیقات

منابع طبیعی استان بوشهر استفاده شد.



شکل ۳-۳: شستشوی اولیه جلبکهای دریایی با آب شیرین



شکل ۳-۴: شستشوی ثانویه جلبکهای دریایی با آب شیرین

## ب-۱-۲- عصاره گیری از جلبکها

به منظور عصاره گیری از جلبکهای مختلف دریایی، ابتدا جلبکهای خشک شده توسط

آسیاب برقی به قطعات ریز تبدیل شده و سپس به وسیله هاون پودر شدند (شکل ۳-۵) تا برای عصاره گیری آماده شوند.



شکل ۳-۵: پودر جلبکهای خشک شده توسط آسیاب برقی

برای تهیه عصاره از روش خیساندن<sup>۱</sup> (Choudhury و همکاران، ۲۰۰۵) با کمی تغییر در حجم حلالها استفاده شد به این صورت که مقدار ۲۰۰ گرم پودر از هر نوع جلبک و در سه تکرار به ۱۰۰۰ میلی لیتر (۵:۱) حلال اضافه شد، برای تهیه عصاره های اتانولی، متانولی و کلروفرمی، مخلوط حاصل به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد و هر چند ساعت یکبار بوسیله یک میله شیشه ای هم زده می شد؛ اما عصاره آبی با حرارت دادن مخلوط به مدت ۴۰ دقیقه حاصل شد و یا به وسیله سوکسله و مدت زمان ۸ ساعت انجام شد (شکلهای ۶-۳ و ۷-۳).

<sup>۱</sup>. Soaking



شکل ۳-۶: تهیه عصاره جلبکها به روش خیساندن



شکل ۳-۷: تهیه عصاره جلبکها به روش سوکسله

پس از مدت ذکر شده محلول رویی با دقت جمع آوری شده و پس از عبور از کاغذ

صافی (کاغذ واتمن شماره ۱) (شکل ۳-۸) جهت حذف حلال از دستگاه روتاری (تقطیر در



خلأ) در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد استفاده شد . مدت زمان استفاده از دستگاه روتاری برای عصاره آبی ۶ ساعت و برای سایر عصاره ها به ۲ ساعت بود. در نهایت عصاره های بدست آمده در پتريدیش های تمیز، زیر هود لامینار قرار گرفت تا بقیه حلال باقیمانده نیز تبخیر شود.



شکل ۳-۸: صاف کردن عصاره های تولید شده به روش خیساندن یا سوکسله توسط کاغذ صافی

میزان عصاره به دست آمده به منظور تعیین درصد آن مورد توزین قرار گرفت . برای توزین عصاره ها، ابتدا پتريدیشهای خالی توزین شده و از وزن پتريدیش ها پس از خشک شده کامل عصاره ها در زیر هود لامینار کم شد تا وزن خالص و خشک هر عصاره به دست آمده حاصل شود. برای همه حلالها از سه تکرار استفاده شد و قبل از روتاری کردن تکرارهای هر تیمار با هم مخلوط می شدند. عصاره ها به میزان  $50 \text{ mg ml}^{-1}$  در حلال مربوطه حل شده و تا استفاده بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (شکل ۳-۹).



شکل ۳-۹: برگرداندن عصاره های توزین شده به حلال خود جهت نگهداری در فریژر ۲۰- درجه

سانتیگراد

## ب-۲- بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره ها

به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره های مختلف از جلبکهای دریایی نمونه

گیری و شناسایی شده از سه روش آزمون حساسیت ضد میکروبی (آنتی بیوگرام)<sup>۱</sup>، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)<sup>۲</sup> و حداقل غلظت کشندگی باکتریایی (MBC)<sup>۳</sup> استفاده شد.

## ب-۲-۱- باکتریهای مورد آزمون

از باکتری های گرم مثبت *باسیلوس سرئبتیلیس* (PTCC ۱۰۲۳)، *استافیلوکوکوس اورئوس*

(PTCC ۱۳۳۷) و باکتریهای گرم منفی *شریشیا کولی* (PTCC ۱۳۹۷)، *ویبریو هاروه ای*

(PTCC ۱۷۵۵) با شناسه ثبت در بانک جهانی ژن (GU 974342, 1) که پیش تر توسط پژوهشکده

<sup>1</sup> Antimicrobial Susceptibility Testing (Antibiogram)

<sup>2</sup> Minimum Inhibitory Concentration

<sup>3</sup> Minimum Bactericidal Concentration

میگو جداسازی و خالص سازی گردیده بود و از سازمان پژوهشهای صنعتی قارچ و باکتری ایران تامین شدند. ویبریو آلترینولیتیکوس از آزمایشگاه بهداشت و بیماریهای پژوهشکده میگوی کشور واقع در استان بوشهر تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفت. برخی از باکتریهای مورد استفاده در این مطالعه پاتوژن و تعدادی نیز غیر پاتوژن بودند.

## ب-۲-۲- تعیین اثر عصاره جلبکها به روش انتشار در آگار<sup>۱</sup> یا روش چاهک<sup>۲</sup> در شرایط برون تن<sup>۳</sup>

آمپول لیوفلیزه باکتریهای تامین شده زیر هود لامینار در شرایط استریل باز شده و به محیط کشت TSB انتقال یافت و سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. از این کشت باکتری به عنوان منبع باکتری در همه آزمونها استفاده شد.

به منظور انجام تست ضدباکتریایی به روش دیسک دیفیوژن از کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط کشت TSB سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند تهیه شد و با استفاده از لوپ بر سطح مولر هیتون آگار، کشت یکنواختی از باکتریها انجام شد. سپس دیسک های بلانک (۶/۴ میلی متر- ساخت شرکت پادتن طب) که با ۵۰ میکرولیتر از عصاره های مختلف از جلبکهای دریایی (طی چندبار به نحوی که حداکثر عصاره ممکن به دیسک ها منتقل شود) استریل (بوسیله فیلتر میکروبی ۰/۴۵ میکرون) آغشته شده بود (شکل ۱۰-۳) و حلال (DMSO) آنها خشک شده بود به وسیله پنس استریل در جاهای مناسب پلیت قرار داد ه شد. در ابتدا پلیت ها به مدت ۳۰

---

<sup>1</sup> Disk Diffusion

<sup>2</sup> Well Mathod

<sup>3</sup> Invitro



دقیقه برای پیش انتشار درون یخچال ( $4^{\circ}\text{C}$ ) نگه داشته شد و بعد از این مرحله به انکوباتور منتقل و ۲۴ ساعت در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. برای هر عصاره سه تکرار انجام شد و از DMSO استریل شده به عنوان کنترل منفی و دیسک اکسی تتراسایکلین ( $20\mu\text{l/disk}$ ) تهیه شده از شرکت ایران دارو به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. هاله های عدم رشد اطراف دیسکها با کولیس اندازه گیری و به صورت میانگین گزارش شد (Kandhasamy و Arunachalam, ۲۰۰۸).



شکل ۳-۱۰: روش تهیه دیسکهای حاوی عصاره های جلبکی

در روش چاهک نیز پس از آماده کردن سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند، کشت یکنواختی از باکتریها در محیط کشت مولر هیتون آگار انجام گرفت. سپس به وسیله میله شیشه ای استریل چاهک هایی به قطر ۶ میلی متر در سطح پلیت ها ایجاد شد و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت  $50\text{mg ml}^{-1}$  هر عصاره در چاهک ها ریخته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. به منظور کنترل مثبت نتایج آزمون از اکسی تتراسایکلین به عنوان کنترل مثبت و از حلال به عنوان کنترل منفی استفاده شد. هاله های عدم رشد اطراف

دیسکها با کولیس اندازه گیری و به صورت میانگین گزارش شد (Kandhasamy و Arunachalam، ۲۰۰۸).

#### ب-۲-۳- تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC)

جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتریها از روش رقت های متوالی در لوله استفاده شد (جلالی و همکاران، ۱۳۸۶). ابتدا از هر عصاره غلظت ۶۴ mg/ml در حلال DMSO ساخته شد و برای استریل شدن از فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرونی گذرانده شد؛ و برای هر عصاره به ازای هر میکروارگانیزم از یک سری ۱۲ تایی لوله های آزمایش استریل شده استفاده شد ده لوله برای غلظتهای مختلف هر عصاره و یک لوله به عنوان کنترل مثبت (واجد باکتری و فاقد عصاره) و یک لوله به عنوان کنترل منفی (واجد عصاره و فاقد باکتری) در نظر گرفته شد. به هر کدام از لوله ها به میزان ۹ میلی لیتر از محیط کشت MHA همراه با غلظت معینی از عصاره (۶۴-۰/۱۲۵ میلی گرم در میلی لیتر) در لوله های شماره یک تا ده و یک میلی لیتر از سوسپانسیون کشت یک شبه باکتری اضافه شد. بدین ترتیب غلظت عصاره در لوله های یک الی ۱۰ به ترتیب ۶۴ تا ۰/۱۲۵ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. لوله ها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری بررسی شدند، کمترین غلظت عصاره که باکتری رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) انتخاب شد (جلالی و همکاران، ۱۳۸۶).

به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) یک میلی لیتر از لوله هایی که باکتری در آنها رشد نکرده بود، روی محیط کشت MHA کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در

۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. پس از طی زمان انکوباسیون کمترین غلظتی از عصاره که باکتری در پلیت رشد نکرده بود، به عنوان غلظت MBC آن عصاره برای میکروارگانیزم خاص در نظر گرفته شد (جلالی و همکاران، ۱۳۸۶).

### ب-۳- تعیین اثر آنتی اکسیدانی عصاره جلبکهای دریایی در شرایط برون تن

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف جلبکهای دریایی به روش آزمون  $\text{DPPH}^{\cdot}$  انجام شد. اندازه گیری فعالیت برداشت رادیکالهای آزاد عصاره های جلبکی به وسیله اندازه گیری  $\text{DPPH}^{\cdot}$  و به روش فتومتری تعیین شد (Kuda و همکاران، ۲۰۰۵). استفاده از رادیکال پایدار  $\text{DPPH}^{\cdot}$ ، برای بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی اسانس ها و عصاره های گیاهی، کاربرد زیادی دارد. حرکت الکترون در سرتاسر مولکول سبب می شود که رادیکال آزاد پایدار  $\text{DPPH}^{\cdot}$  نتواند به صورت دایمر درآمده و تولید رنگ بنفش کند. این رادیکال آزاد چربی دوست بوده و دارای بیشترین جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر است. ۰/۲ میلی لیتر محلول عصاره جلبکی با همین حجم اتانول مخلوط شده و سپس ۰/۰۲۵ میلی لیتر از محلول متانولی یک هزارم مول  $\text{DPPH}^{\cdot}$  به آن اضافه شد، پس از نیم ساعت انکوبه شدن در دمای اتاق، مقدار جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف نورسنج خوانده شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد و از حلال مربوطه هر عصاره به عنوان کنترل یا بلانک و از اسید اسکوربیک یا ویتامین C به عنوان نمونه

---

<sup>1</sup> 2,2'-diphenyl-1-picryl hydrazyl

استاندارد استفاده شد. <sup>۱</sup> RSA یا فعالیت برداشت رادیکال آزاد به صورت درصد و براساس بی

رنگ شدن محلول DPPH و از روش فرمول زیر محاسبه شد:

$$RSA(\%) = (A_{blank} - A_{sample}) / A_{blank} \times 100$$

در این رابطه  $A_{sample}$  میزان جذب نمونه پس از نیم ساعت،  $A_{blank}$  میزان جذب کنترل می

باشد. به منظور بررسی دقیق تر فعالیت آنتی رادیکالی عصاره جلبکها و مقایسه آنها با هم از

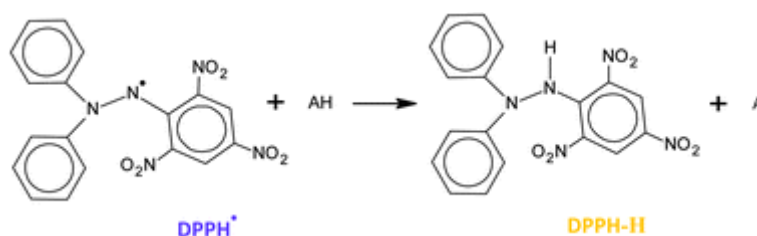
فاکتور  $EC_{50}$ <sup>۲</sup> استفاده شد که بیانگر مقداری از عصاره است که قادر است ۵۰ درصد از رادیکال

آزاد (DPPH) موجود در محیط را خنثی کند (شکل ۱۰-۳). برای محاسبه فاکتور  $EC_{50}$  ابتدا

نموداری از رابطه میان مقادیر غلظتهای عصاره و درصد جذب  $DPPH^{\cdot}$  رسم شد و با توجه به

نمودار حاصل غلظتی از عصاره که قادر به خنثی کردن ۵۰ درصد  $DPPH^{\cdot}$  بدست آمد (Rastian و

همکاران، ۲۰۰۷).



شکل ۳-۱۱: فرمول رادیکال آزاد DPPH و نحوه غیر فعال شدن آن

<sup>۱</sup> Radical Scavenging Activity

<sup>۲</sup> 50% Extract Concentration

## ب-۴- تهیه و غنی سازی آرتمیا

### ب-۴-۱- تهیه و تفریخ سیست آرتمیا

سیست آرتمیا فرانسیسکانا (INVE, Belgium) از یک مرکز تکثیر در استان بوشهر تهیه شد. سیست خشک آرتمیا طبق روش استاندارد (Sorgeloos و همکاران، ۲۰۰۱) تفریخ شد. ابتدا سیستمهای آرتمیا با محلول ۲۰۰ پی پی ام هیپوکلریت سدیم به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شده و سپس با آب شیرین به خوبی شستشو شدند تا باقیمانده ماده ضدعفونی کننده به طور کامل برداشته شود. ۵۰ گرم و ۷۰ گرم سیست آرتمیا در ۱۰ لیتر آب درطی (۳۵ppt) اتوکلاو شده، در دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتیگراد و هوادهی شدید و مداوم و یک رژیم نوری (۲۰۰۰ لوکس) مداوم در مدت ۲۴ ساعت در دو ظرف استوانه ای مخروطی تفریخ شدند. پس از تفریخ، ناپلی های مرحله اینستار I با استفاده از خاصیت نورگرایی مثبت آنها از پوسته ها جداسازی و جمع آوری شدند و با استفاده از صافی ۱۲۰ میکرونی و آب شیرین شستشو و برای آزمونهای بعدی آماده شدند.

### ب-۴-۲- بررسی اثر سمیت عصاره های مختلف جلبکهای دریایی برای آرتمیا

به منظور بررسی اثر سمیت عصاره های مختلف تهیه شده از جلبکهای مختلف طبق روش Coldwell و همکاران (۲۰۰۳) با کمی تغییر انجام شد. ۱۰ عدد ناپلی زنده و فعال مرحله اینستار ۱ بوسیله پیپت پاستور در ویال حاوی ۹ میلی لیتر آب دریای استریل (شوری ۳۵ppt) قرار داده شد و به هر ویال یک میلی لیتر عصاره جلبکهای انتخاب شده که در DMSO با غلظتهای ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی گرم در میلی لیتر حل شده بود اضافه شد. سمیت غلظتهای

مختلف از عصاره های متفاوت جلبکهای دریایی انتخاب شده (بر اساس نتایج اثرات ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی) پس از ۲۴ ساعت و از طریق شمارش تعداد ناپلی های مرده و مقایسه آنها با گروه شاهد که فقط دارای DMSO بود محاسبه شد. هر گروه دارای سه تکرار بود و نتیجه ارزیابی سمیت عصاره های مختلف جلبکها نسبت به ناپلی آرتم یا به صورت غلظت کشنده ۵۰٪ جمعیت (LC<sub>50</sub>)<sup>۱</sup> و با کمک روش آماری آنالیز پروبیت<sup>۲</sup> بیان شد.

### ب-۴-۳- غنی سازی ناپلی آرتمیا

۲۴ ساعت پس از انکوباسیون سیست آرتمیا، ناپلی مرحله اول (اینستار I) پدیدار می گردد که در این مرحله به دلیل بسته بودن مخرج قادر به تغذیه نیستند؛ ام ۱۲ ساعت بعد لاروها پوست اندازی کرده و وارد مرحله دوم ناپلی (اینستار II) می شوند که در این مرحله تغذیه شروع شده و قادرند ذرات کوچکتر از ۵۰ میکرون را مورد تغذیه قرار دهند. لذا این مرحله از ناپلی به عنوان حامل عصاره جلبکهای دریایی (بیوانکپسولیشن<sup>۳</sup>) در غنی سازی مورد استفاده قرار گرفت. غنی سازی طبق روش استاندارد (Sorgeloos و Kulasekarapandian، ۱۹۸۴) انجام شد. عصاره جلبک های انتخاب شده (بر اساس نتایج مراحل قبل) به نسبت های مختلف (۰، ۲۰۰، ۴۰۰ mg ml<sup>-1</sup> و ۶۰۰) در اتانول خالص حل شدند و از این محلول ها به عنوان ماده غنی ساز استفاده شد.

به منظور غنی سازی از بطریهای پلاستیکی ۱.۵ لیتری استفاده شد. این بطریها حاوی یک لیتر آب دریای استریل و ناپلی اینستار II با تراکم ۱۰۰-۱۲۰ ناپلی در میلی لیتر بود که ۲ میلی

<sup>1</sup> 50% Lethal Concentration

<sup>2</sup> Probit Analysis

<sup>3</sup> Bioencapsulation

لیتر از ماده غنی سازی نیز به آن اضافه می شد دارای هوادهی ملایم بود به نحویکه ضمن حفظ میزان اکسیژن مورد نیاز، انتشار مواد غذایی هم در حد مناسب در محیط کشت وجود داشته باشد. هر تیمار دارای سه تکرار و طول مدت غنی سازی ۸ ساعت بود. ناپلیوسها پس از غنی سازی در الک ۱۲۰ میکرونی شستشو شده و مستقیماً مورد استفاده میگوها قرار می گرفتند. ۱ اینکه تا استفاده بعدی در دمای ۴ درجه سانتیگراد با هوادهی ملایم قرار می گرفتند.

#### ب-۵- تهیه و نگهداری بچه میگوها

بهمنظور اجرای تحقیق تعداد ۱۰۰۰۰ عدد پست لارو میگوی سفید غربی<sup>۱</sup> ۱۲ روزه (PL<sub>12</sub>)<sup>۲</sup> از یک مرکز تکثیر تجاری واقع در شهرستان دلواری (۳۰ کیلومتری محل آزمایش) در استان بوشهر خریداری و به سالن آزمایش که قبلاً آماده سازی شده بود منتقل شدند. جهت انتقال پست لاروها از کیسه های نایلونی دوجداره حاوی یک سوم آب و دو سوم اکسیژن با شوری ۳۵ قسمت در هزار و در یونولیت های حاوی یخ و خاک اره استفاده شد.

پس از انتقال پست لاروها به سالن پرورش، به منظور پیشگیری از استرس پس از عملیات سازگاری پست لاروها به تانکها منتقل شدند. پس از شستن لایه بیرونی پلاستیک ها با آب شیرین ابتدا تمامی پلاستیک ها بدون اینکه باز شوند در درون آب تانک ذخیره به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند تا دمای آب درون پلاستیک ها با آب تانک، یکی شود (شکل ۲-۳). سپس در کیسه های حاوی بچه میگو که باز شده و بدون اینکه آب موجود در آن خالی شود، هر چند دقیقه یکبار مقداری از آب تانک به آب موجود در پلاستیک اضافه می شد تا پست لاروها کم کم به آب جدید

<sup>1</sup> *Litopenaeus vannamei*

<sup>2</sup> Post Larvae 12

عادت کنند، پس از چند دقیقه تمامی محتویات پلاستیک در دو تانک ۵۰۰ لیتری خالی شد. پس از تنظیم هوادهی، به مدت ۸ ساعت سالن آزمایش ترک و از غذا دهی به پست لاروها خودداری شد.



شکل ۳-۱۲: سازگارسازی پست لاروهای خریداری شده قبل از ذخیره سازی

تا شروع آزمایش بچه میگوها به مدت ۱۰ روز در این تانکها سازگاری پیدا کردند. طی شرایط سازگاری روزانه سه وعده از غذای پلت تجاری (شرکت هووراش، بو شهر، ایران- سایز ۰/۱ میلی متر)، استفاده می کردند و هر ۲ روز یکبار، آب تانکها به میزان ۳۰ درصد تعویض و سیفون مواد غذایی باقیمانده و مدفوع انجام می شد. در ضمن آب جایگزین ۳۰ درصد آب دریا (شوری ۴۰ ppt) بود به نحوی که در پایان دوره سازگاری و طی زمان آزمایش از آب دریا استفاده می شد. سعی شد دمای آب طی زمان دوره سازگاری و آزمایش در دامنه  $29 \pm 1/5$  حفظ شود.



ب-۶- تعیین اثر عصاره جلبکهای منتخب بر کاهش بار آلودگی باکتریایی در شرایط درون

تن<sup>۱</sup>

عصاره های جلبکهایی که در آزمایشگاه اثرات بازدارندگی خوبی داشتند و همچنین برای موجود زنده نیز سمیت کمی داشتند (نتایج آزمون سمیت عصاره ها برای آرتیمیا) برای این قسمت کار انتخاب شدند. از باکتری *V.harveyi* نیز که در شرایط طبیعی قادر به ایجاد مشکل در سیستم تکثیر و پرورش میگو است به عنوان عامل آلوده کننده به صورت تجربی انتخاب شد.

ب-۶-۱- تهیه و آماده سازی باکتری

از کلنی های تک باکتری *V.harveyi*، ۱۸ ساعته روی محیط TSA نمکی (۲٪) توسط لوپ استریل به ویالهای حاوی ۱۰ میلی لیتر آب دریای فیلتر شده (۰/۲ میکرون) اضافه شد تا در OD<sub>540</sub> عدد یک به دست بیاید، این غلظت تقریباً برابر  $10^9$  CFU ml<sup>-1</sup> می باشد (Kandhasamy و Arunachalam، ۲۰۰۸). سپس این سوسپانسیون باکتریایی سانتریفیوژ شد (۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه) آنگاه مایع رویی دور ریخته شد و سلولهای باکتری ته نشین شده دوباره در ۱۰ میلی لیتر آب دریای فیلتر شده حل شد و با روش رقت سازی سریالی غلظتهای کمتر ( $10^8$ ،  $10^7$ ،  $10^6$  و  $10^5$ ) مورد نیاز تهیه و برای آلوده کردن بچه میگوها استفاده شد.

---

<sup>1</sup> *In vivo*

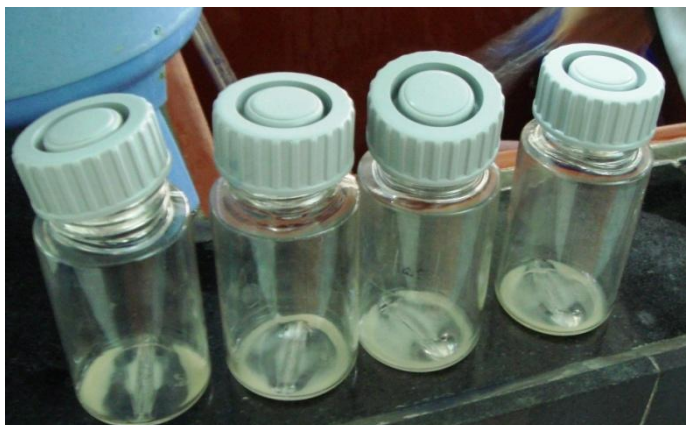
<sup>2</sup> Colony Forming Unit

## ب-۶-۲- تعیین دز کشنده ۵۰٪ (LD<sub>50</sub>)<sup>۱</sup> باکتری *V.harveyi* برای میگوی وانامی

قبل از استفاده از باکتری *V.harveyi* در آکواریوم حاوی میگو و در آزمایش اصلی، به منظور رسیدن به دز تحت حاد باکتری، ابتدا پاتوژنیسیته<sup>۲</sup> باکتری مذکور برای میگوهای مورد استفاده طبق روش Aguirre-Guzman و همکاران (۲۰۰۵) بررسی شد. تعداد ۳۰ عدد بچه میگوی سالم (۰/۰۳-۰/۰۲ گرم) که در آکواریومهای پلاستیکی (با هوادهی، شوری ۴۰ppt و دمای ۲۸±۱ درجه سانتیگراد) نگهداری می شدند، به سطلهای (شکل) حاوی باکتری با دزهای مختلف (۱۰<sup>۰</sup>، ۱۰<sup>۶</sup>، ۱۰<sup>۷</sup>، ۱۰<sup>۸</sup>، ۱۰<sup>۹</sup> CFU ml<sup>-1</sup>) منتقل شده و به مدت ۲ ساعت در این شرایط نگهداری شدند. بعد از این مدت میگوها پس از شستشو با آب استریل شده دریا به آکواریومهای قبلی برگردانده و میزان تلفات طی ۹۶ ساعت پایش و ثبت شد. هر دز دارای سه تکرار بود و طی دوران پایش، میگوها روزی دوبار توسط غذای تجاری تغذیه شده و روزانه تلفات هر آکواریوم جمع آوری و ثبت می شد، در این زمان هیچ تعویض آبی انجام نشد. LD<sub>50</sub> با کمک روش آماری آنالیز پروبیت و رسم نمودار مربوطه (محور افقی مربوط به دز و محور عمودی مربوط به میزان تلفات) محاسبه شد.

<sup>۱</sup> 50% Letal Dose

<sup>۲</sup> Pathogenicity



شکل ۳-۱۳: باکتریهای شستشو شده و سانتریفیوژ شده

#### ب-۶-۳- شرایط و روش آزمایش

بر اساس نتایج LD<sub>50</sub> باکتری ویبریو هاروه ای از دز ۱۰<sup>۶</sup>CFU/ml برای آلوده سازی بچه میگوهای مورد پرورش استفاده شد. تعداد ۳۶۰۰ عدد پست لارو ۲۵ روزه میگوی وانامی با میانگین وزنی ۰/۸۸ ± ۶ میلی گرم و میانگین طولی ۲/۴ ± ۱۰/۶ میلی متر در ۱۲ تیمار و ۳۶ تکرار که هر تکرار دارای ۱۰۰ عدد پست لارو بود، طبق جدول شماره ۳-۱ در آکواریومهای پلاستیکی ذخیره سازی شدند. بر اساس نتایج آزمونهای تعیین اثرات ضدباکتریایی، آنتی اکسیدانی و تعیین سمیت عصاره های جلبکی، تنها عصاره های اتانولی ۴ جلبک انتخاب شده، با غلظتهای مختلف از ۶۰۰ - ۲۰۰ mg/l به شرح جدول ۳-۱ جهت ادامه مطالعه در شرایط درون تن انتخاب شدند.

جدول ۳-۱: تیمار بندی بچه میگوهای تحت آزمایش

نام گروه	تعریف	شرایط آزمایش
C+	کنترل مثبت	آرتمیای غنی سازی نشده + ویبریو هاروه ای
C-	کنترل منفی	آرتمیای غنی سازی نشده، بدون ویبریو هاروه ای

S(۲۰۰)	سارگاسوم (۲۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + ویبریو هاروه ای
S(۴۰۰)	سارگاسوم (۴۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + ویبریو هاروه ای
S(۶۰۰)	سارگاسوم (۶۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + ویبریو هاروه ای
L(۲۰۰)	لورنسیا (۲۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + ویبریو هاروه ای
L(۴۰۰)	لورنسیا (۴۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + ویبریو هاروه ای
L(۶۰۰)	لورنسیا (۶۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + ویبریو هاروه ای
G(۳۰۰)	گراسیلاریا (۳۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + ویبریو هاروه ای
G(۶۰۰)	گراسیلاریا (۶۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + ویبریو هاروه ای
K(۳۰۰)	کاپافیکوس (۳۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + ویبریو هاروه ای
K(۶۰۰)	کاپافیکوس (۶۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + ویبریو هاروه ای

تیمارهای فوق به مدت ۳۰ روز نگهداری تحت شرایط دمایی  $29 \pm 2$  درجه سانتیگراد، شرایط شوری  $42 \pm 1/5$  نگهداری شد و روزانه ۳ بار در ساعات ۸، ۱۴ و ۲۲ طبق جدول ۲-۳ غذادهی انجام شد و به منظور حفظ کیفیت آب پرورش هر دو روز یکبار ۲۰٪ آب تعویض می شد.

جدول ۲-۳: برنامه زمانی و مقدار غذادهی گروه کنترل و سایر تیمارهای مورد آزمون.

ساعات غذادهی	نوع غذا	درصد غذادهی
۸ صبح	غذای تجاری پلت	۲۵٪ جیره کل
۲ بعد از ظهر	آرتمیای غنی شده/غنی نشده	۵۰٪ جیره کل
۱۰ شب	غذای تجاری پلت	۲۵٪ جیره کل

به منظور ایجاد آلودگی مصنوعی در محیط پرورش، میگوی همه تیمارها به جز تیمار کنترل منفی، در روز اول پرورش به مدت ۳۰ دقیقه در ظرف حاوی  $10^6$  CFU/ml باکتری ویبریو

هاروی قرار گرفته، سپس به محل پرورش برگردانده شدند و پس از هر تعویض آب ۱۰ میلی لیتر از همین دز باکتری به آب پرورش میگوهای مورد آزمون (به جز کنترل منفی) اضافه می شد (Immanuel و همکاران، ۲۰۰۴).

#### ب-۶-۴-روش نمونه برداری و تعیین بار آلودگی

هر ۱۰ روز از تعدادی از میگوهای مورد آزمایش (۵ عدد از هر تکرار) به صورت تصادفی نمونه گیری شد. نمونه ها پس از غوطه وری در محلول ۵۰ پی پی ام فرمالین به منظور از بین بردن باکتریهای سطحی بدن میگوها و سپس شستشوی با آب استریل (جهت از بین بردن باقیمانده محلول ضدعفونی کننده) در ۵ میلی لیتر محلول نرمال سالین هموژن شده و به روش لوله های متوالی تا  $10^{-5}$  رقیق شدند. نیم میلی لیتر از این نمونه رقیق شده به وسیله پیت استریل برداشته و به محیط کشت TCBS اضافه شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری (۳۰ درجه سانتیگراد) شد. هر تیمار دارای سه تکرار بود. پس از انکوباسیون کلونیهای باکتریهای رشد کرده به کمک شمارشگر دیجیتال شمارش شده و طبق فرمول زیر میزان باکتریهای موجود در هر گرم بافت میگو محاسبه شد.

وزن نمونه (g) / فاکتور رقت × تعداد کلونیهای شمارش شده = تعداد باکتری ( $CFU g^{-1}$ )

## ب-۷- تعیین درصد بقای بچه میگوها و فاکتورهای رشد

در پایان ۳۰ روز پرورش با شمارش میگوهای زنده و بر اساس روش (Immanuel و همکاران، ۲۰۰۱) درصد بازماندگی میگوها (فرمول ۱) محاسبه شد. شاخص های رشد در هر تیمار با اندازه گیری طول و وزن نهایی میگوها محاسبه شد. میزان وزن کسب کرده طی دوران پرورش از طریق کم کردن وزن اولیه از وزن نهایی به دست آمد و نرخ رشد ویژه به روش (Immanuel و همکاران، ۲۰۰۱) و از طریق فرمول ۲ محاسبه شد.

فرمول ۱: تعداد میگوی اولیه / ۱۰۰ × (تعداد میگوی زنده ثانویه) = بازماندگی (%)

فرمول ۲: روزهای پرورش / ۱۰۰ × (لگاریتم طبیعی وزن اولیه - لگاریتم طبیعی وزن

ثانویه) = نرخ رشد ویژه (SGR)(%)

## ب-۸- تعیین میزان مقاومت میگوها در برابر عامل پاتوژن (*V.harveyi*)

پس از پایان دوره آزمایش قبلی ۱۰ عدد از میگوهای باقیمانده هر تکرار را برداشته و در آکواریومهای ضد عفونی و شستشو شده، با همان نام تیمار قبلی ذخیره سازی شد، شرایط پرورش و تغذیه بدون افزودن باکتری به مدت ۱۰ روز دیگر ادامه پیدا کرد. پس از این ۱۰ روز کلیه تیمارها با دز کشنده ویبریو هاروی ( $3 \times 10^8$  cfu/ml) به مدت ۲ ساعت مواجهه<sup>۱</sup> داده شدند، سپس به آکواریومهای مورد پرورش برگردانده شدند و میزان تلفات هر ۱۲ ساعت و طی یک هفته پایش و ثبت شد، طی این مدت میگوها همچنان با جیره غذایی سابق مورد تغذیه قرار می گرفتند و هر

---

<sup>۱</sup>. Challenge

دو روز یکبار تعویض آب و سیفون مدفوع، پوسته ها و مواد غذایی باقیمانده انجام می شد. درصد تلفات از فرمول زیر محاسبه شد (Manilal و همکاران، ۲۰۱۲).

$$100 \times (A - \text{تعداد میگوهای اولیه}) / (A - \text{تعداد میگوهای مرده}) = \text{تلفات تجمعی (\%)}$$

در فرمول بالا، A مساوی تعداد میگوهای مرده در روز اول چالنج می باشد که این تلفات معمولاً بر اثر استرس وارده اتفاق می افتد (Manilal و همکاران، ۲۰۱۲). با استفاده از فرمول زیر درصد محافظت کننده نسبی (PRP)<sup>۱</sup> مربوط به هر عصاره در برابر عامل بیماری نیز محاسبه شد.

$$\text{PRP \%} = (\% \text{ تلفات در گروه کنترل} / \text{تلفات در گروه تیمار}) - 1 \times 100$$

## ب-۹- آنالیز آماری داده ها

بررسی نتایج آزمونها و مقایسه میانگین داده ها از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه<sup>۲</sup> و از نسخه ۱۸ نرم افزار SPSS استفاده شد. مقایسه میانگین داده ها در این آزمون نیز از روش حداقل تفاوت های معنی دار (LSD)<sup>۳</sup> استفاده شد و  $P < 0.05$  به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل داده های فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسیدانی از آزمون توکی (Tucky HSD) استفاده شد. رسم نمودارها با نرم افزار Microsoft Office Excel 2007 انجام شد.

<sup>1</sup> Percent Relative Protection

<sup>2</sup> One Way ANOVA

<sup>3</sup> Low Significant differentiation (LSD)





## فصل چهارم

### نتایج

## الف-نتایج شناسایی و آماده سازی جلبکهای دریایی

### الف-۱- نتایج شناسایی جلبکهای دریایی

۷ گونه مختلف، از ۱۰ مرحله نفونه گیری از ۵ ایستگاه در اطراف شهر بوشهر به دست

آمد که این جلبکها شامل ۶ جنس بود که در سه گروه عمده، جلبکهای سبز (*Codium*)، جلبکهای

قرمز (*Gracilaria, Laurencia, Kappaphycus*) و جلبکهای قهوه ای (*Sargassum, Padina*) قرار

می گرفتند. نام گونه و مختصات جغرافیایی م محل نمونه گیری هر یک از جلبکها در جدول

۴-۱ نشان داده شده است.

جدول ۴- ۱: گونه های جداسازی شده در فصول و ایستگاههای مختلف از سواحل شهرستان بوشهر

نام کلاس	نام گونه	محل نمونه گیری	مختصات جغرافیایی	فصل نمونه گیری
Chlorophyta جلبک سبز	<i>Codium iyengarii</i>	ریشهر	۲۸° ۵۱' ۴۹" N ۵۰° ۵۱' ۳۶" E	زمستان
Rodophyta جلبک قرمز	<i>Gracilaria corticata</i>	اسکله جفره	۲۸° ۵۷' ۴۳" N ۵۰° ۵۱' ۴۹" E	زمستان
	<i>Laurencia snyderiea</i>	ریشهر	۲۸° ۵۱' ۴۹" N ۵۰° ۵۱' ۳۶" E	زمستان
	<i>Kappaphycus alvarezi</i>	ریشهر	۲۸° ۵۱' ۴۹" N ۵۰° ۵۱' ۳۶" E	زمستان
Phaeophyta جلبک قهوه ای	<i>Sargassum ilicifolium</i>	جزیره عباسک	۲۸° ۵۸' ۴۲" N ۵۰° ۵۰' ۳۶" E	پاییز

پاییز	۲۸° ۵۸' ۴۲" N	جزیره عباسک	<i>Sargassum angustifolium</i>
	۵۰° ۵۰' ۳۶" E		
زمستان	۲۸° ۵۰' ۱۶" N	هلیله	<i>Padina borgesseni</i>
	۵۰° ۵۲' ۵۷" E		

شکلهای ۱-۴ الی ۷-۴ تصاویر جلبکهای شناسایی شده به همراه نام علمی آنها را نشان می دهد که به وسیله کلیدهای شناسایی معتبر و کارشناسان خبره مرکز تحقیقات چابهار و مرگز تحقیقات منابع طبیعی استان بوشهر انجام شده است.

#### الف-۱-۱- شرح مختصری از خصوصیات مورفولوژی جلبکها:

##### الف ۱-۱-۱- مشخصات جلبک *Sargassum angustifolium* (Agardh 1948)

سارگاسوم یک جنس از ماکروجلبک ها، در رده جلبکهای قهوه ای است که گونه های متعدد آن در سراسر مناطق معتدله و گرمسیری جهان گسترش دارند . گونه های این جنس بیشترین شباهت به گیاهان عالی خشکیها دارند و ممکن است به طول چند متر برسند، رنگ این جلبکها عمدتاً قهوه ای یا سبز تیره بوده و از یک نگاهدارنده (Hold fast)، یک ساقه کوتاه و تشکیلات برگ مانند تشکیل شده اند (قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹).

رنگ گونه *S. angustifolium* قهوه ای متمایل به زرد است، محور اصلی، استوانه ای، کوتاه، محکم و به قطر ۳-۵ میلی متر بوده و دارای چندین انشعاب اولیه برخاسته از قاعده است . انشعابات اولیه استوانه ای، صاف، کشیده و باریک (قطر ۱-۱/۵ mm) و دارای وزیکولهای کروی

پایه دار با راس گرد می باشند (شکل ۸-۴). برخی از برگهای انشعابات فرعی بسیار کوتاه و باریک و دارای دندانهای کوتاه و نامنظم بوده و این گونه جلبک به وسیله صفحات نگاهدارنده به بسترهای صخره ای می چسبد (Hamdy و Dawes, ۱۹۸۹).



شکل ۴-۱: جلبک *Sargassum angustifolium* جداسازی شده از سواحل شهر بوشهر

#### الف ۱-۱-۲- مشخصات جلبک (*Sargassum ilicifolium* Agardh 1948)

رنگ این گونه قهوه ای متمایل به زرد است . محور اصلی آن گرد و با چندین انشعاب اولیه است . ساختار ساقه مانند استوانه ای و صاف با صفحه کوچک گوه ای می باشد، دارای چندین انشعاب از کنار برگها می باشد. برگها در انشعابات اولیه مستطیلی شکل و کشیده، با دندانهای تیز در حاشیه می باشند که حدود دو تا سه سانتیمتر طول و ۴-۵ میلیمتر پهنا دارند. رگبرگها ظریف و نازک بوده اکثرا پیدا نیستند، برگهای روی انشعابات فرعی، مستطیلی تا اندکی نیزه ای با طول یک تا دو سانتیمتر و عرض ۳-۴ میلیمتر و واجد روزنه های کوچک و پراکنده در سطح برگها می باشند. وزیکولهای هوایی کروی، نوک تیز با قطر ۲-۳ میلی متر که روی یک پایه فشرده

قرار دارند، ارتفاع تال آنها به ۴۰-۳۰ سانتی متر می رسد. این جلبکها در قسمتهای پایینی و اعماق کم منطقه جزر و مدی و روی سطوح صخره ای می رویند (قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹).



شکل ۴-۲: جلبک *Sargassum ilicifolium* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر

#### الف-۱-۱-۳- مشخصات جلبک *Laurencia snyderiae* (Dawson)

این گونه در رده جلبکهای قرمز قرار می گیرد . رنگ این گونه قهوه ای تیره تا ارغوانی است و بافت آن غشایی، سفت و اندکی شکننده است . انشعابات افراشته این گونه دارای تعداد زیادی برجستگی های پستانک مانند در طول محور اصلی می باشد (شکل ۹-۴). محور اصلی نیز مشخص و مجزا بوده که از صفحه نگاهدارنده برخاسته است و ارتفاع تال<sup>۱</sup> (اندام ساقه مانند) ۵-۱۰ سانتی متر است. محل رویش جلبک در ناحیه پایین محدوده بین جزر و مدی و روی سطح بسترهای صخره ای است (قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹).

---

<sup>۱</sup> . Tallus



شکل ۴-۳: جلبک *Laurencia snyderiae* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر

#### الف-۱-۱-۴- مشخصات جلبک (*Gracilaria corticata* (Agardh 1948)

گراسیلاریا نیز یک جنس از جلبکهای قرمز است که به دلیل وجود میزان زیادی آگار در این جنس (آگاروفیت) و مصرف به عنوان غذای انسان واجد اهمیت اقتصادی زیادی است، به طوریکه هم اکنون در بسیاری از کشورهای در حال توسعه در قاره های آسیا، آمریکای جنوبی، آفریقا و اقیانوسیه کشت می شود (رضوی شیرازی، ۱۳۸۵).

طبقه بندی جلبکهای راسته Graciariales هنوز غیرشفاف است و به شکل واقعی مشخص نشده ولی چیزی که مشخص است این است که بیش از ۱۰۰ گونه از این گروه فقط در جنس *Gracilaria* قرار گرفته است که عمدتاً در نواحی معتدله و نیمه استوایی پراکنده هستند.

رنگ گونه *G. corticata* متمایل به ارغوانی تا قهوه ای است . بافت جلبک به صورت غضروفی است و نمای آن بوته ای و به صورت بادبزنی با تقسیمات دوتایی نامنظم وجود دارد . این گونه در قاعده فشرده بوده و چندین محور اصلی از قاعده منشعب می گردد (شکل ۱۰-۴).



این جلبک به وسیله نگاهدارنده صفحه ای به صخره می چسبد، محل رویش این گونه بیشتر حوضچه های صخره ای در قسمت های میانی و پایینی محدوده بین جزر و مدی است (قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹)



شکل ۴-۴: جلبک *Gracilaria corticata* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر

#### الف-۱-۱-۵- مشخصات جلبک *Padina boergeseni* (Alender & Kraft)

پادینا یک جنس از جلبک های قهوه ای است که به صورت بوته ای رشد می کند . گونه *Padina boergeseni* به رنگ قهوه ای تیره است، دارای چندین لوب شکننده بادبزنی شکل دارد که واجد شکاف های عمیقی می باشند . لوب ها در قاعده باریک و به سمت بالا پهن می شوند (شکل ۴-۱۱). محل رویش این جلبک معمولاً در محدوده منطقه بین جزر و مدی روی سطح بسترهای صخره ای است . برای چسبیدن به این سطوح از صفحات نگاهدارنده خود استفاده می کنند. در خلیج فارس طی فصول پاییز و زمستان دیده می شوند (قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹).



شکل ۴-۵: جلبک *Padina borgesseni* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر

#### الف-۱-۱-۶- مشخصات جلبک *Kappaphycus alvarezii* (Tony)

این جلبک گونه ای از جلبکهای قرمز است که معمولاً به رنگ سبز یا زرد دیده می شود

(Paeula و همکاران، ۲۰۰۲). دارای ساختارهای ساقه مانند محکم، گوشتی و نرمی است که گاهی

به طول دو متر می رسند، این ساختارها دارای انشعابات کوتاهی (۱-۲ سانتیمتر) می باشند که در

قاعده تعداد آنها کم می شود . این گونه جلبک بیشتر در مناطق گرمسیری دیده می شود که به

خاطر رشد سریع و میزان قابل توجه کاراگینان، چند سالی است که پرورش آن مورد توجه قرار

گرفته است (Paeula و همکاران، ۲۰۰۲).





شکل ۴-۶: جلبک *Kappaphycus alvarezii* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر

#### الف-۱-۱-۷- مشخصات جلبک *Codium iyengarii* (Borgessen)

جنس کودیوم از رده جلبکهای سبز می باشد. گونه *Codium iyengarii* سبز تیره بوده و دارای بافتی گوشتی به شکل استوانه ای با انشعابات گرد می باشد که هر انشعاب به طور منظم دو شاخه می شود. این گونه دارای صفحه نگاهدارنده کوتاه می باشد. ارتفاع تال در این گونه ۱۵-۲۵ سانتی متر و قطر آن ۳-۷ می لی متر می باشد (قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹). محل رویش این جلبک بیشتر در قسمتهای میانی تا پایینی محدوده جزر و مدی و بر روی بسترهای صخره ای است.



شکل ۴-۷: جلبک *Codium iyengarii* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر

## الف-۲- نتایج عصاره گیری از جلبکهای دریایی

درصد وزنی عصاره های مختلف جلبکهای دریایی در جدول ۴-۲ نشان داده شده است.

همانطور که مشاهده می شود، بیشترین درصد وزنی میزان عصاره به دست آمده به مقدار ۷/۷

درصد وزن خشک جلبک مربوط به عصاره کلروفرمی جلبک سبز *C. iyengarii* و کمترین

مقدار آن با میزان ۲/۵۴ درصد وزن عصاره خشک مربوط به عصاره آبی جلبک قرمز *snyderiae*

*L.* بود.

جدول ۴-۲: فعالیت ضدباکتریایی عصاره های مختلف از جلبکهای دریایی مورد آزمون

نام علمی جلبک	حلال	وزن خشک جلبک (گرم)	وزن عصاره خشک (گرم)	عصاره (%)
<i>C. iyengarii</i>	اتانول	۲۰۰	۹/۱۳	۴/۵۶
	متانول	۲۰۰	۱۲/۳۴	۶/۱۷
	کلروفرم	۲۰۰	۱۵/۴۱	۷/۷

آب	۲۰۰	۱۰/۲۳	۳/۱۱	<i>G. corticata</i>
اتانول	۴۰۰	۲۳/۵۶	۵/۸۹	
متانول	۴۰۰	۲۴/۳۳	۶/۰۸	
کلروفرم	۴۰۰	۱۹/۱۸	۴/۷۹	
آب	۴۰۰	۱۸/۱۶	۲/۵۴	<i>L. snyderiae</i>
اتانول	۴۰۰	۲۶/۱۲	۶/۵۳	
متانول	۴۰۰	۲۱/۶	۵/۴	
کلروفرم	۴۰۰	۲۴/۴۵	۶/۱۱	
اتانول	۳۵۰	۱۴/۷۶	۴/۲۲	<i>K. alvarezii</i>
متانول	۳۵۰	۱۳/۴۹	۳/۸۵	<i>S. ilicifolium</i>
کلروفرم	۳۵۰	۱۶/۲۸	۴/۶۵	
اتانول	۵۰۰	۳۵/۳۱	۷/۰۶	<i>S. angustifolium</i>
متانول	۵۰۰	۳۴/۱۹	۶/۸۴	
کلروفرم	۵۰۰	۳۷/۱۴	۷/۴۳	
آب	۵۰۰	۳۰/۴۷	۳/۰۹	
اتانول	۲۰۰	۸/۷۵	۳/۷۰	<i>P. borgesseni</i>
متانول	۲۰۰	۷/۴۱	۴/۳۷	
کلروفرم	۲۰۰	۹/۶	۴/۸	

## ب- نتایج آزمونهای باکتری شناسی

### ب-۱- نتایج آزمونهای حساسیت

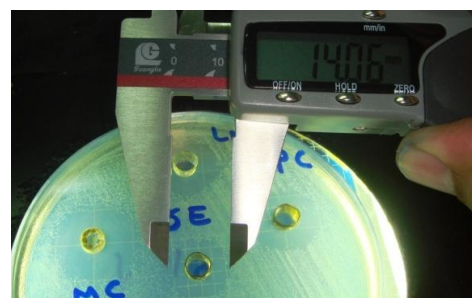
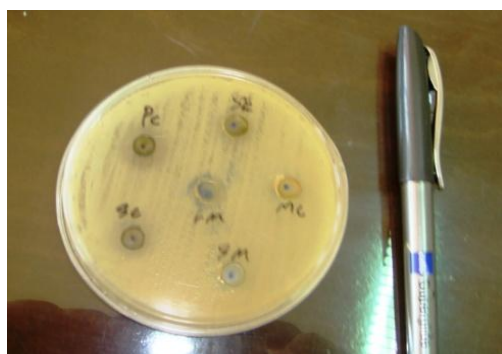
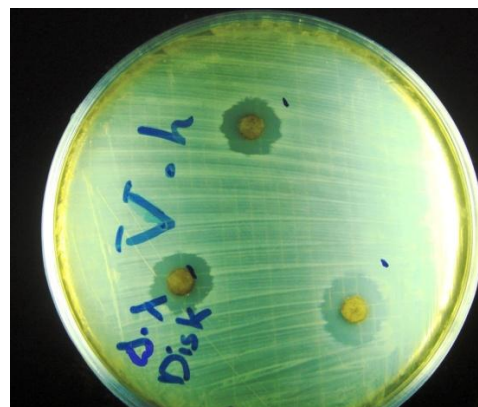
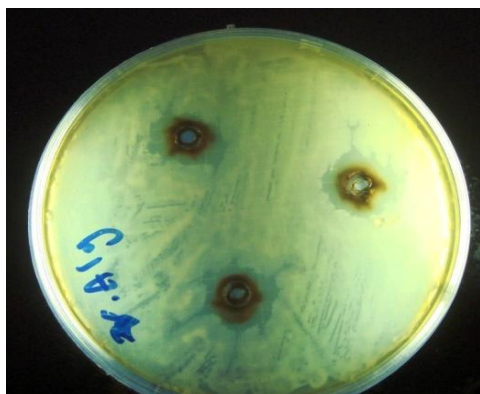
نتایج نشان داد که اکثر عصاره های مختلف جلبکهای دریایی اثرات ضدباکتریایی خوبی

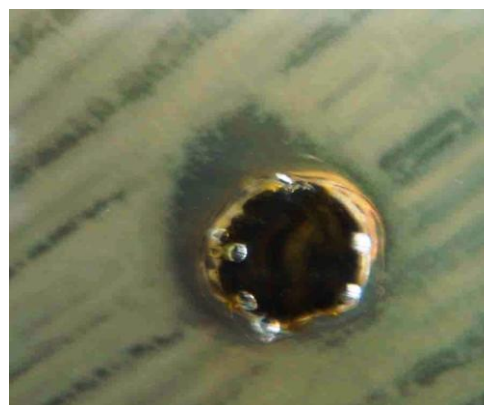
هم بر باکتریهای گرم مثبت و هم گرم منفی داشتند، همچنین اثرات ضدباکتریایی هم در مورد

باکتریهای بیماریزا و هم باکتریهای غیر بیماریزا دیده شد، نمونه هایی از اشکال اثرات آنتی

باکتریال عصاره های جلبکی به صورت آزمون آنتی بیوگرام و به روشهای انتشار در دیسک یا

انتشار در چاهک در شکل ۴-۸ دیده می شود.





شکل ۴-۸: اثر ضدباکتریایی برخی از عصاره های جلبکهای جداسازی شده از سواحل خلیج فارس

خلاصه این نتایج در جدول شماره ۴-۳ درج شده است. همانطور که مشاهده می شود

تمامی عصاره های جلبکهای قهوه ای *S.angustifolium* و *P.borgesseni* روی تمامی باکتریهای

مورد آزمون موثر بودند و عصاره های جلبک سبز *C. iyengarii* کمترین اثر ضدباکتریایی روی

باکتریهای مورد آزمون داشت. از میان عصاره های مختلف نیز به نظر می رسد، عصاره های

کلروفومی دارای اثرات ضدباکتریایی قوی تری بودند و عصاره های آبی اکثر جلبکها فاقد اثرات

ضدباکتریایی و یا در برخی موارد دارای اثرات بسیار کمی بود، لذا از درج آنها در همه جداول

صرف نظر شده است.

جدول ۴-۳: فعالیت ضد باکتریایی عصاره های مختلف جلبکهای دریایی خلیج فارس

فعالیت ضد پاتوژن					حلال	جلبک دریایی
<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>V.harveyi</i>		
++	++	—	++	++	اتانول	<i>S. angustifolium</i>
+	++	—	++	++	متانول	
++	+++	+	++	+++	کلروفرم	
++	NT	—	—	—	اتانول	<i>S. ilicifolium</i>

متانول	-	-	NT	+	-	<i>C. iyengarii</i>
کلروفرم	-	+	+	+	++	
اتانول	-	-	+	++	+	
متانول	-	-	+	NT	-	<i>K. alvarezii</i>
کلروفرم	-	+	NT	-	-	
اتانول	++	+	-	NT	++	
متانول	++	+	+	++	NT	<i>L. snyderia</i>
کلروفرم	+	++	-	+	+++	
اتانول	++	++	++	+	+	
متانول	+++	++	++	++	NT	<i>G. corticata</i>
کلروفرم	+++	++	NT	++	++	
اتانول	+++	+++	-	++	NT	
متانول	++	++	-	++	NT	<i>P. borgessni</i>
کلروفرم	+++	++	-	++	NT	
اتانول	-	-	-	++	+	
متانول	-	NT	-	++	++	
کلروفرم	-	+	NT	++	++	

(-) بدون فعالیت ضدباکتریایی، (+) فعالیت ضد باکتریایی اندک (میلی متر < ۷ هاله)، (++) فعالیت ضد باکتریایی متوسط (هاله = ۷-۱۰ میلی متر)، (+++) فعالیت ضد باکتریایی بالا (میلی متر > ۱۰ هاله)، (NT) آزمایش نشده.

جداول ۴-۴ تا ۴-۱۰ فعالیت ضدباکتریایی عصاره های مختلف جلبکهای دریایی را به

صورت کامل تر و با جزئیات بیشتر، بر اساس اندازه هاله عدم رشد بیان می کنند.

همانطور که در جد اول دیده می شود ویبریو هاروی به عنوان پاتوژن میگوها بیشترین

حساسیت نسبت به عصاره اتانولی جلبک *G.corticata* با قطر هاله عدم رشد  $16/9 \pm 2/8$  میلی

متر از خود نشان داده و پس از آن عصاره کلروفرمی جلبک *L.snyderiae* با هاله عدم رشد

$16/7 \pm 3$  میلی متر قرار دارد، به طوریکه این حساسیتها نسبت به آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین

( $13/3 \pm 0/4$ ) نیز بیشتر بود.

از طرفی عصاره های آبی به جز در برخی موارد در اکثر مواقع اثر بازدارندگی بر رشد

باکتریهای مورد آزمون نداشتند (جداول ۴-۴ تا ۴-۱۰).

به جز عصاره های آبی کم اثرترین عصاره بر اصلی ترین پاتوژن میگو (*V.harveyi*)

عصاره متانولی جلبک *C. iyengarai* با هاله عدم رشد  $3/5 \pm 0/5$  بود. اثر سایر عصاره های جلبکی

بر باکتریهای مورد آزمون در جداول ۴-۴ تا ۴-۱۰ دیده می شود.

جدول ۴-۴: میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های جلبک

*S.angustifolium* بر باکتریهای مختلف

عصاره	<i>V.harveyi</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aurues</i>
اتانولی	$9/4 \pm 1/8^a$	$9 \pm 1/3^a$	$0^a$	$9/2 \pm 0/8^a$	$8/8 \pm 0/6^a$
متانولی	$8/2 \pm 2/1^a$	$7/1 \pm 2/4^a$	$0^a$	$8/2 \pm 0/9^a$	$6/5 \pm 1/7^b$
کلروفرمی	$9/4 \pm 1/4^a$	$8/3 \pm 0/4^a$	$7/7 \pm 1/2^b$	$12/2 \pm 1/7^b$	$9/5 \pm 2/6^a$
آبی	$0^b$	$0/4 \pm 0/2^b$	$0^a$	$0/2 \pm 0/1^c$	$1/2 \pm 0/3^c$
OTC	$13/3 \pm 0/4^c$	$15/4 \pm 0/5^c$	$19/7 \pm 0/3^c$	$23/4 \pm 1/4^d$	$24/6 \pm 0/8^d$

\*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی دار بودن آماری نتیجه است.

جدول ۴-۵: میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های جلبک

*S.ilicifolium* بر باکتریهای مختلف

عصاره	<i>V.harveyi</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aurues</i>
اتانولی	, <sup>a</sup>	, <sup>a</sup>	, <sup>a</sup>	NT	۹/۸ $\pm$ ۱/۶ <sup>a</sup>
متانولی	, <sup>a</sup>	, <sup>a</sup>	NT	۵ $\pm$ ۰/۸ <sup>a</sup>	,
کلروفرمی	, <sup>a</sup>	۴/۳ $\pm$ ۰/۴ <sup>b</sup>	۶/۷ $\pm$ ۱ <sup>a</sup>	۴/۲ $\pm$ ۱/۳ <sup>a</sup>	۹/۵ $\pm$ ۲/۳ <sup>a</sup>
آبی	, <sup>a</sup>	, <sup>a</sup>	NT	۰/۵ $\pm$ ۰/۱ <sup>b</sup>	NT
OTC	۱۳/۳ $\pm$ ۰/۴ <sup>b</sup>	۱۵/۴ $\pm$ ۰/۵ <sup>c</sup>	۱۹/۷ $\pm$ ۰/۳ <sup>b</sup>	۲۳/۴ $\pm$ ۱/۴ <sup>c</sup>	۲۴/۶ $\pm$ ۰/۸ <sup>b</sup>

\*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی دار بودن آماری نتیجه است.

جدول ۴-۶: میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های جلبک *C.iyengrii*

بر باکتریهای مختلف

عصاره	<i>V.harveyi</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aurues</i>
اتانولی	, <sup>a</sup>	, <sup>a</sup>	۶/۵ $\pm$ ۲/۱ <sup>a</sup>	۹/۵ $\pm$ ۱/۸ <sup>a</sup>	۳/۸ $\pm$ ۰/۶ <sup>a</sup>
متانولی	, <sup>a</sup>	, <sup>a</sup>	۵/۲ $\pm$ ۰/۸ <sup>a</sup>	NT	, <sup>b</sup>
کلروفرمی	, <sup>a</sup>	, <sup>a</sup>	۵/۲ $\pm$ ۰/۶ <sup>a</sup>	NT	, <sup>b</sup>
آبی	, <sup>a</sup>	, <sup>a</sup>	NT	۱/۵ $\pm$ ۰/۳ <sup>b</sup>	NT
OTC	۱۳/۳ $\pm$ ۰/۴ <sup>b</sup>	۱۵/۴ $\pm$ ۰/۵ <sup>c</sup>	۱۹/۷ $\pm$ ۰/۳ <sup>b</sup>	۲۳/۴ $\pm$ ۱/۴ <sup>c</sup>	۲۴/۶ $\pm$ ۰/۸ <sup>b</sup>

\*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی دار بودن آماری نتیجه است.



جدول ۴-۷: میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های جلبک

*K.alvarezii* بر باکتریهای مختلف

عصاره	<i>V.harveyi</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aurues</i>
اتانولی	۹/۵ $\pm$ ۱/۵ <sup>a</sup>	۵/۵ $\pm$ ۲ <sup>a</sup>	۰ <sup>a</sup>	NT	۹ $\pm$ ۰/۹ <sup>a</sup>
متانولی	۸/۵ $\pm$ ۱/۷ <sup>a</sup>	۶ $\pm$ ۱/۲ <sup>a</sup>	۳/۵ $\pm$ ۱ <sup>b</sup>	۷/۵ $\pm$ ۰/۸ <sup>a</sup>	NT
کلروفرمی	۶/۷ $\pm$ ۱/۱ <sup>a</sup>	۷/۳ $\pm$ ۰/۷ <sup>a</sup>	۱۴/۵ $\pm$ ۱/۹ <sup>c</sup>	۷/۵ $\pm$ ۲/۵ <sup>a</sup>	۱۴/۱ $\pm$ ۱/۵ <sup>b</sup>
آبی	۱/۵ $\pm$ ۱ <sup>b</sup>	۱ <sup>b</sup>	NT	۱/۶ $\pm$ ۰/۲ <sup>b</sup>	NT
OTC	۱۳/۳ $\pm$ ۰/۴ <sup>c</sup>	۱۵/۴ $\pm$ ۰/۵ <sup>c</sup>	۱۹/۷ $\pm$ ۰/۳ <sup>d</sup>	۲۳/۴ $\pm$ ۱/۴ <sup>c</sup>	۲۴/۶ $\pm$ ۰/۸ <sup>c</sup>

\*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی دار بودن آماری نتیجه است.

جدول ۴-۸: میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های جلبک

*G.corticata* بر باکتریهای مختلف

عصاره	<i>V.harveyi</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aurues</i>
اتانولی	۱۶/۹ $\pm$ ۲/۸ <sup>a</sup>	۱۷ $\pm$ ۳/۳ <sup>a</sup>	۰ <sup>a</sup>	۹/۲ $\pm$ ۰/۸ <sup>a</sup>	NT
متانولی	۹/۲ $\pm$ ۲/۱ <sup>b</sup>	۷/۱ $\pm$ ۲/۴ <sup>b</sup>	۰ <sup>a</sup>	NT	NT
کلروفرمی	۱۴/۴ $\pm$ ۳/۴ <sup>ad</sup>	۸/۳ $\pm$ ۰/۴ <sup>b</sup>	۰ <sup>a</sup>	NT	NT
آبی	۱/۵ $\pm$ ۱ <sup>c</sup>	۱ <sup>c</sup>	۰ <sup>a</sup>	۲/۲ $\pm$ ۰/۳ <sup>b</sup>	NT
OTC	۱۳/۳ $\pm$ ۰/۴ <sup>d</sup>	۱۵/۴ $\pm$ ۰/۵ <sup>a</sup>	۱۹/۷ $\pm$ ۰/۳ <sup>b</sup>	۲۳/۴ $\pm$ ۱/۴ <sup>c</sup>	۲۴/۶ $\pm$ ۰/۸ <sup>a</sup>

\*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی دار بودن آماری نتیجه است.

جدول ۴-۹: میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های جلبک

*L.snyderiae* بر باکتریهای مختلف

عصاره	<i>V.harveyi</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aurues</i>
-------	------------------	------------------------	---------------	-------------------	-----------------

اتانولی	۹/۶±۱/۸ <sup>a</sup>	۸/۸±۱ <sup>a</sup>	۸/۴±۱/۲ <sup>a</sup>	۶/۵±۱/۵ <sup>a</sup>	۵±۰/۶ <sup>a</sup>
متانولی	۱۴/۵±۲/۸ <sup>b</sup>	۸±۱/۵ <sup>a</sup>	۷/۵±۱ <sup>a</sup>	NT	NT
کلروفرمی	۱۶/۷±۳ <sup>c</sup>	۹/۳±۰/۸ <sup>a</sup>	NT	۸/۵±۲/۱ <sup>a</sup>	۹±۱/۹ <sup>b</sup>
آبی	۲/۵±۱ <sup>d</sup>	۲±۱/۱ <sup>b</sup>	۱/۴±۱ <sup>b</sup>	<sup>b</sup>	NT
OTC	۱۳/۳±۰/۴ <sup>e</sup>	۱۵/۴±۰/۵ <sup>c</sup>	۱۹/۷±۰/۳ <sup>c</sup>	۲۳/۴±۱/۴ <sup>c</sup>	۲۴/۶±۰/۸ <sup>c</sup>

\*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی دار بودن آماری نتیجه است.

جدول ۴- ۱۰: میانگین ± انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره های جلبک

*P. borgeseni* بر باکتریهای مختلف

عصاره	<i>V.harveyi</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aurues</i>
اتانولی	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	۹/۵±۱/۳ <sup>a</sup>	۴/۵±۰/۵ <sup>a</sup>
متانولی	<sup>a</sup>	NT	<sup>a</sup>	۸/۳±۲/۱ <sup>a</sup>	۷/۵±۱/۶ <sup>b</sup>
کلروفرمی	<sup>a</sup>	۴/۳±۰/۸ <sup>b</sup>	NT	۸±۲/۱ <sup>a</sup>	۷±۱/۳ <sup>b</sup>
آبی	NT	NT	NT	NT	NT
OTC	۱۳/۳±۰/۴ <sup>b</sup>	۱۵/۴±۰/۵ <sup>c</sup>	۱۹/۷±۰/۳ <sup>b</sup>	۲۳/۴±۱/۴ <sup>b</sup>	۲۴/۶±۰/۸ <sup>c</sup>

\*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی دار بودن آماری نتیجه است.

## ب-۲- نتایج MIC و MBC

جداول ۴- ۱۱ تا ۴- ۱۷ کمترین غلظتهایی از هر عصاره که توانایی مهار رشد (MIC)

باکتری می شود و کمترین غلظت هر عصاره که موجب کشته شدن ۹۹٪ باکتریها می شود

(MBC) را نشان می دهد. همانطور که در این جداول دیده می شود، کمترین غلظتی از عصاره ها

که موجب مهار رشد باکتریهای مورد آزمون شده است برابر ۰/۲۵ mg/ml و مربوط به عصاره های

کلروفومی جلبکهای *L.snyderiae* و *P.borgesseni* و روی باکتری *B. subtilis* بود. از طرفی کمترین غلظتی از عصاره ها که موجب مهار رشد باکتری ویبریو هاروی به عنوان باکتری پاتوژن میگوها شده است مربوط به عصاره های اتانولی و کلروفومی جلبکهای *L.snyderiae* و *G.corticata* و همچنین عصاره کلروفومی جلبک *S.angustifolium* غلظت ۲mg/ml و بیشترین آن مربوط به عصاره اتانولی *K.alvarezii* با غلظت ۸mg/ml بود (جداول ۴-۱۱ تا ۴-۱۷).

کمترین میزان MBC از بین عصاره های متفاوت جلبکهای مختلف مربوط به عصاره های کلروفومی جلبکهای *S.angustifolium*، *G.corticata*، *L.snyderiae* و همچنین عصاره اتانولی جلبک *L.snyderiae* با غلظت ۴mg/ml بود و عصاره اتانولی *K.alvarezii* با غلظت ۳۲mg/ml بود که نسبت به سایر موارد از مقدار بیشتری برخوردار بود.

جدول ۴-۱۱: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) جلبک

*S.angustifolium* برای باکتریهای مورد آزمون بر حسب mg/ml

باکتری	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفومی	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
<i>V.harveyi</i>	۴	۸	۸	۸	۲	۴
<i>V.alginolyticus</i>	۸	۸	۴	۸	۴	۴
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	۰/۵	۰/۵
<i>B.subtilis</i>	۱	۲	۱	۱	۰/۵	۱
<i>S.aurues</i>	۰/۵	۱	۲	۴	۱	۱

جدول ۴-۱۲: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره های

جلبک *S.ilicifolium* برای باکتریهای مورد آزمون

باکتری	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
<i>V.harveyi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>V.alginolyticus</i>	-	-	-	-	۱۶	-
<i>E.coli</i>	۴	-	NT	NT	۴	-
<i>B.subtilis</i>	NT	NT	۴	۸	۴	-
<i>S.aurues</i>	۴	-	-	-	۲	-

جدول ۴-۱۳: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) جلجک

*C.iyengarii* برای باکتریهای مورد آزمون

باکتری	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
<i>V.harveyi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>V.alginolyticus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i>	۸	۴	۱	۲	-	-
<i>B.subtilis</i>	۲	NT	NT	NT	NT	NT
<i>S.aurues</i>	۴	-	-	-	-	-

جدول ۴-۱۴: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) جلجک

*K.alvarezii* برای باکتریهای مورد آزمون

بakteri	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
<i>V.harveyi</i>	۸	۳۲	۱۶	۳۲	۸	۸
<i>V.alginolyticus</i>	۳۲	۳۲	۸	۸	۱۶	۱۶
<i>E.coli</i>	–	–	–	–	۱	۰/۵
<i>B.subtilis</i>	۴	۴	۲	۴	۸	۴
<i>S.aureus</i>	NT	NT	۲	۴	۱	۱

جدول ۴-۱۵: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) جلبک

*G.corticata* برای باکتریهای مورد آزمون

بakteri	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
<i>V.harveyi</i>	۲	۸	۸	۸	۴	۲
<i>V.alginolyticus</i>	۸	۸	۴	۸	۱۶	۴
<i>E.coli</i>	–	–	–	–	–	–
<i>B.subtilis</i>	۲	۴	NT	NT	NT	NT
<i>S.aureus</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT

جدول ۴-۱۶: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) جلبک

*L.snyderiae* برای باکتریهای مورد آزمون

بakteri	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC

<i>V.harveyi</i>	۲	۴	۴	۳۲	۲	۴
<i>V.alginolyticus</i>	۱۶	۱۶	۱۶	۸	۸	۱۶
<i>E.coli</i>	۰/۵	۲	۱	۴	NT	NT
<i>B.subtilis</i>	۱	۲	NT	NT	۰/۲۵	۱
<i>S.aurues</i>	۰/۵		NT	NT	۲	۲

جدول ۴-۱۷: حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) جلبک

*P.borgessenii* برای باکتریهای مورد آزمون

باکتری	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
<i>V.harveyi</i>	-	-	-	-	-	-
<i>V.alginolyticus</i>	-	-	NT	NT	۴	۱۶
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	NT	NT
<i>B.subtilis</i>	۲	۴	۴	۰/۲۵	۱	
<i>S.aurues</i>	۴	۸	۱۶	۴	۸	

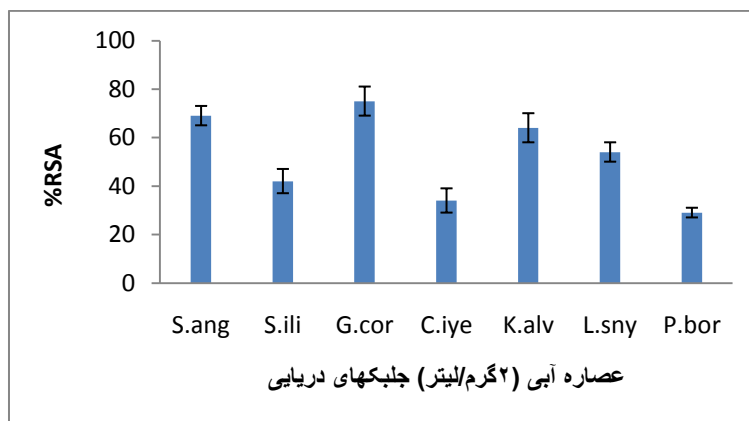
## ج-نتایج بررسیهای آنتی اکسیدانی

بررسی اثرات آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف جلبکهای دریایی از طریق برداشت

رادیکال آزاد و به روش DPPH انجام شد، نتایج فعالیت برداشت رادیکال آزاد در ۴ عصاره آبی،

اتانولی، متانولی و کلروفرمی ۷ جلبک مورد آزمون با غلظت ۲ mg/ml به صورت میانگین درصد کاهش میزان DPPH در نمودارهای ۱-۴ تا ۴-۴ نمایش داده شده است.

همان طور که در نمودارهای ۱-۴ تا ۴-۴ دیده می شود، جلبک قرمز *G.corticata* با غلظت ۲ mg/ml در اکثر موارد دارای بیشترین اثر آنتی اکسیدانی (از طریق برداشت رادیکال آزاد DPPH) بود و کمترین اثر مربوط به جلبک قهوه ای *P.borgesseni* بود که این اختلاف بین این دو گروه دارای تفاوت معنی دار بود ( $P < 0/01$ ). قدرت سایر جلبکها در برداشت رادیکال آزاد بین این دو جلبک قرار داشتند که اختلافها برخی معنی دار و بعضی از نظر آماری معنی دار نبودند ( $P < 0/05$ ).

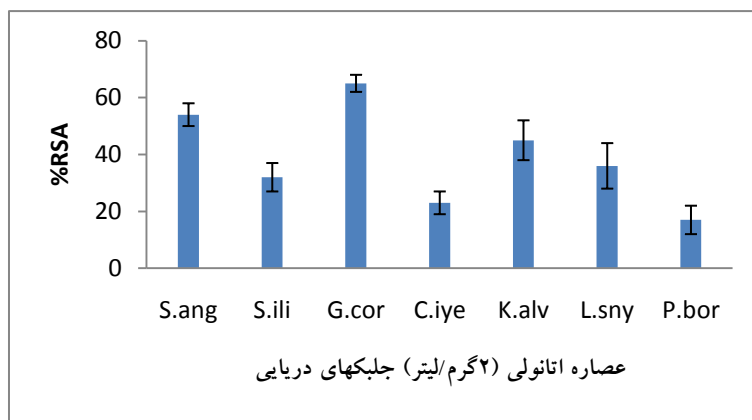


نمودار ۱-۴: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) عصاره آبی جلبکهای مختلف به روش DPPH. بارها نشانگر اختلاف معیار است.

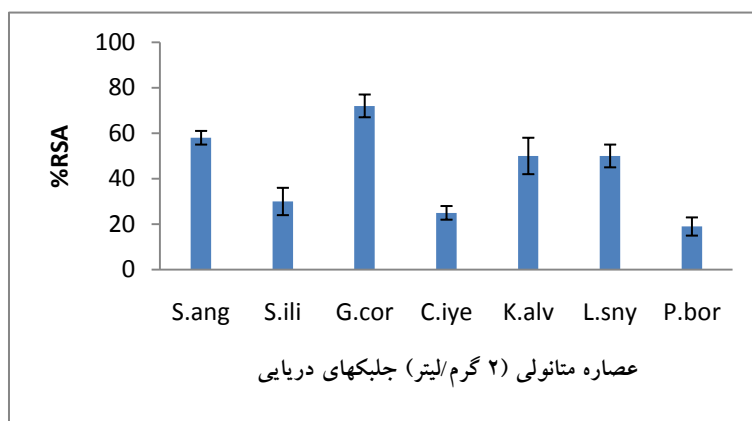
همان طور که در نمودارهای ۱-۴ تا ۴-۴ دیده می شود عصاره آبی جلبکها در اکثر موارد اثرات آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به سایر عصاره ها داشتند و بیشترین درصد برداشت رادیکال آزاد در غلظت ۲ mg/ml با  $75 \pm 6/4\%$  مربوط به عصاره آبی جلبک قرمز *G.corticata* بود و پس

از آن عصاره آبی *S.angustifolium* با  $69 \pm 4\%$  قوار داشت که از نظر آماری اختلاف معنی داری

وجود نداشت (نمودار ۴-۱).

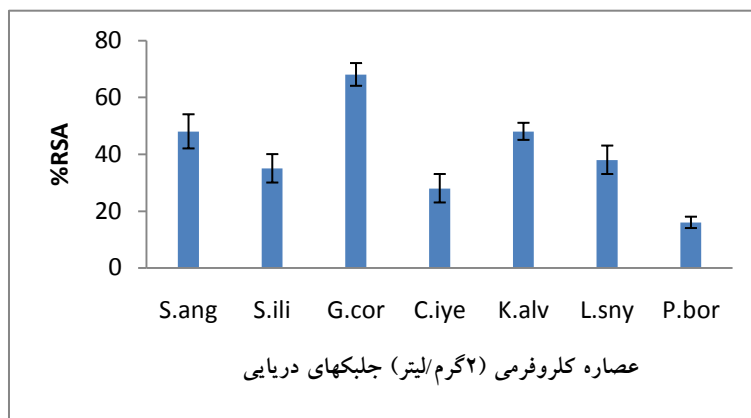


نمودار ۴-۲: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) عصاره اتانولی جلبکهای مختلف به روش DPPH. بارها نشانگر انحراف معیار می باشند.



نمودار ۴-۳: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) عصاره متانولی جلبکهای مختلف به روش DPPH. بارها نشانگر انحراف معیار می باشند.

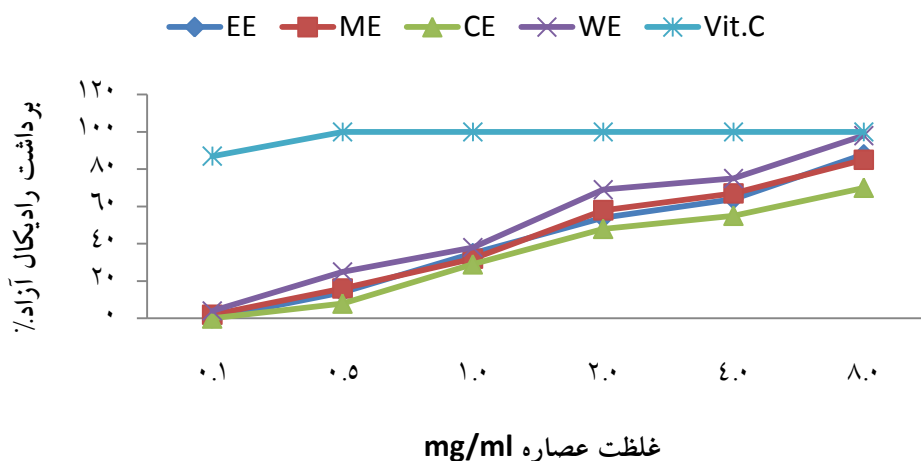




نمودار ۴-۵: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) عصاره کلروفومی جلبکهای مختلف به روش  $DPPH^{\bullet}$ . بارها میزان انحراف معیار را نشان می دهند.

نمودارهای ۴-۵ تا ۴-۱۱ تاثیر غلظت عصاره های مختلف جلبکها در برداشت رادیکال

آزاد  $DPPH^{\bullet}$  و مقایسه آن با ویتامین C به عنوان آنتی اکسیدان قوی و شاهد نشان می دهد، همانطور که مشاهده می شود در تمامی موارد با افزایش غلظت عصاره ها میزان برداشت رادیکال آزاد نیز بیشتر می شود.



نمودار ۴-۵: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظتهای مختلف عصاره آبی،

اتانولی، متانولی و کلروفومی جلبک *S.anguistifolium* با ویتامین C به روش حذف  $DPPH^{\bullet}$

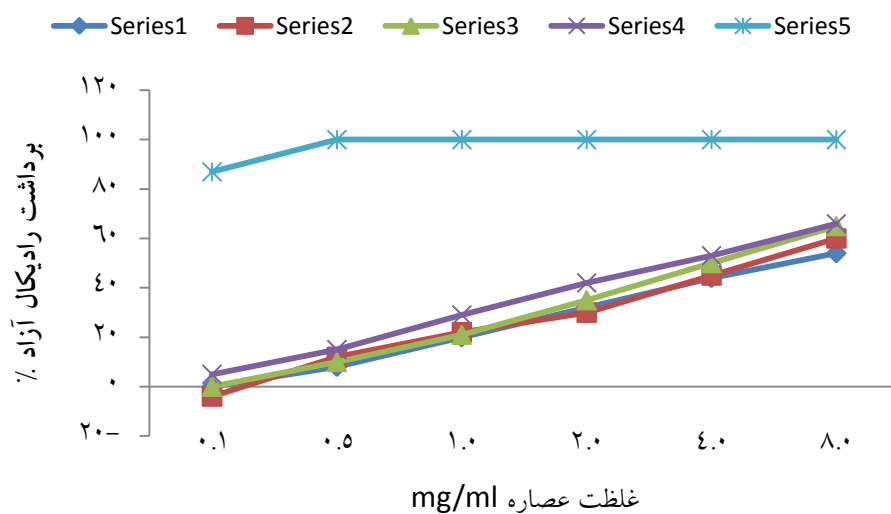
همانطور که نمودارهای ۴-۵ تا ۴-۱۱ مشاهده می شود، عصاره آبی همه جلبکها نسبت

به سایر عصاره ها، دارای قدرت بیشتری در برداشت رادیکال آزاد DPPH بود که این نتیجه از

نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0.01$ )، پس از آن در بیشتر موارد عصاره متانولی از قدرت رت آنتی

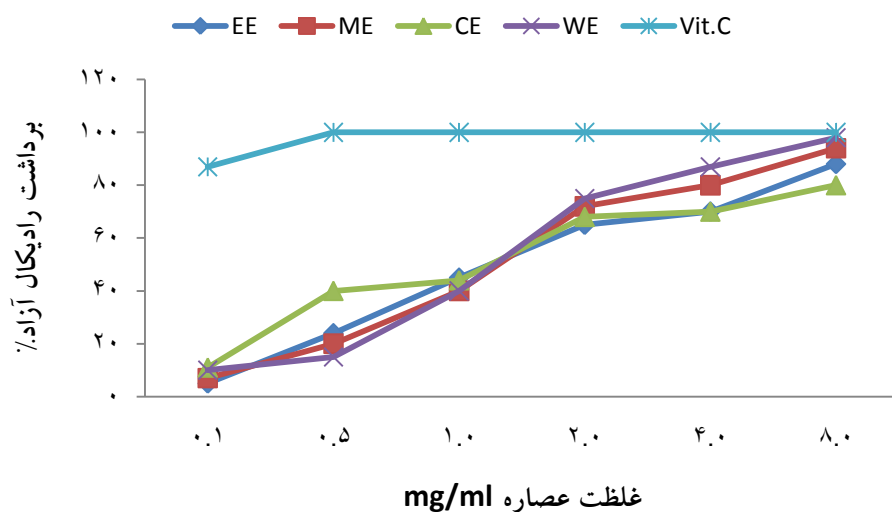
اکسیدانی بیشتری برخوردار بود و سپس اتانولی یا در برخی موارد عصاره کلروفرمی قدرت

برداشت رادیکال آزاد بیشتری داشت که این اختلافها معنی دار نبود ( $P < 0.05$ ).

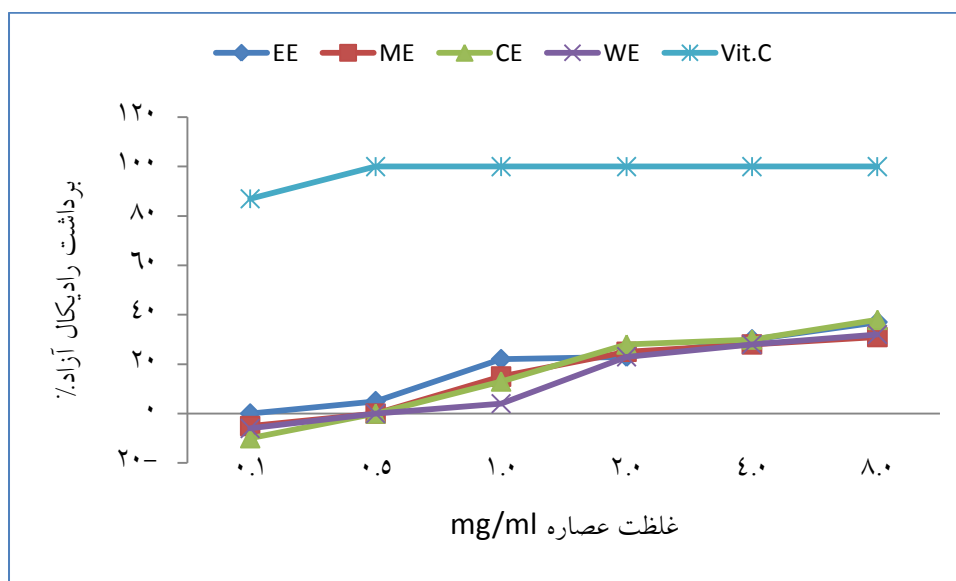


نمودار ۴-۶: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظتهای مختلف عصاره آبی،

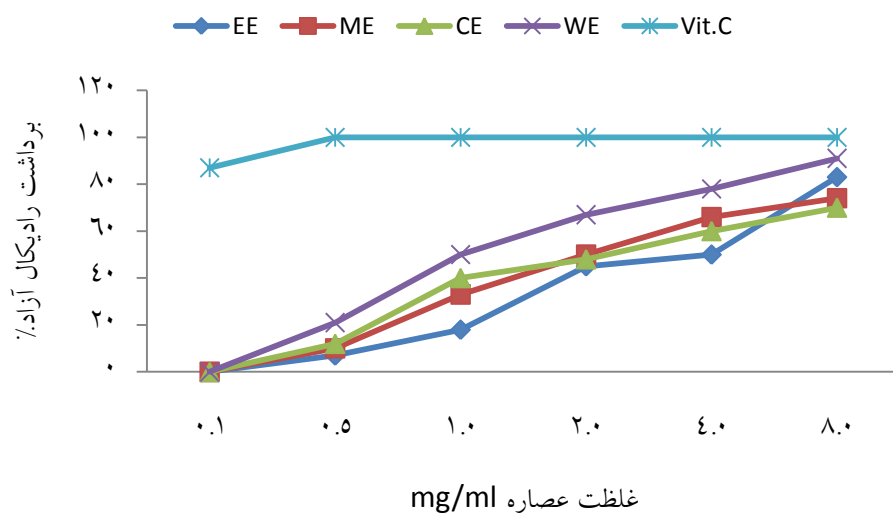
اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *S.ilicifolium* با ویتامین C به روش حذف DPPH



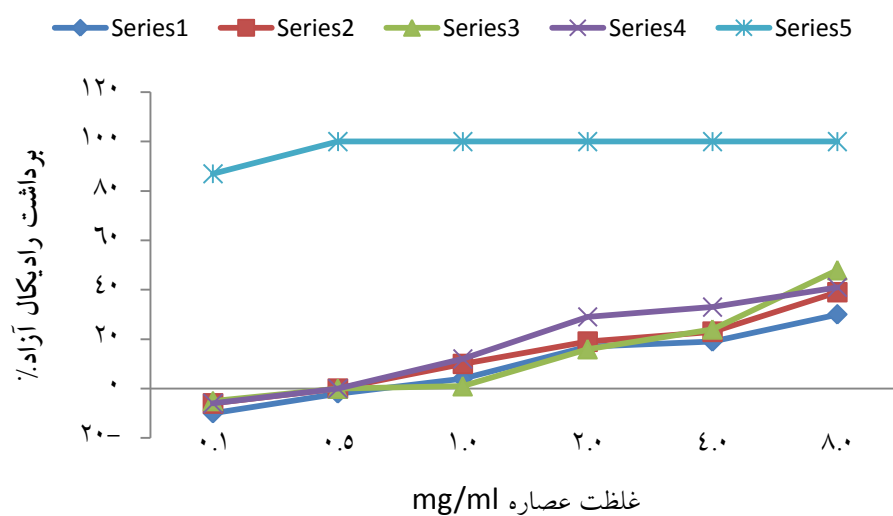
نمودار ۴-۷: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظتهای مختلف عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *G.corticata* با ویتامین C به روش حذف DPPH



نمودار ۴-۸: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظتهای مختلف عصاره آبی، عصاره اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *C.iyengari* با ویتامین C به روش حذف DPPH



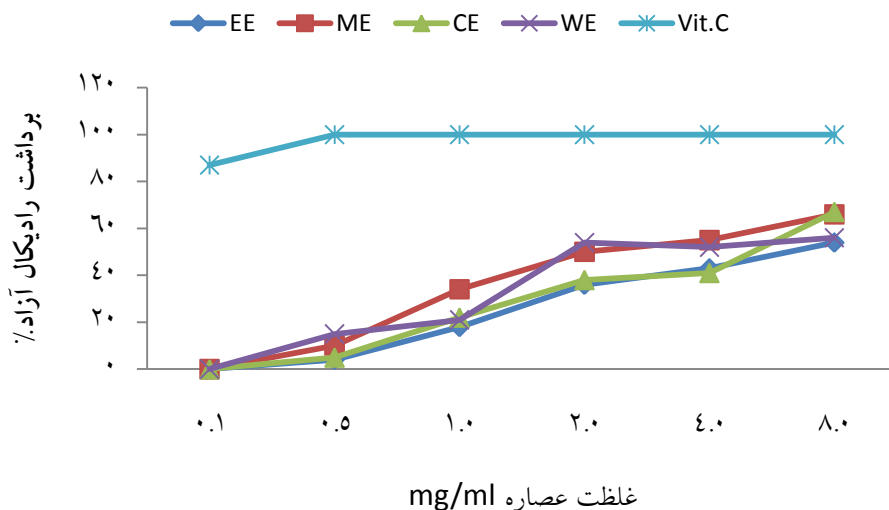
نمودار ۴-۹: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظتهای مختلف عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *K.alvarezii* با ویتامین C به روش حذف DPPH



نمودار ۴-۱۰: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظتهای مختلف عصاره آبی، عصاره اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *P.borgesseni* با ویتامین C به روش حذف DPPH

نمودارهای ۵-۴ تا ۲۰-۴ همچنین نشان می دهند فعالیت آنتی اکسیدانی تمامی عصاره

های جلبکی وابسته به غلظت آنها می باشد و با افزایش غلظت توانایی حذف رادیکال آزاد DPPH نیز بیشتر می شود.



نمودار ۴-۱۱: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظتهای مختلف عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *L.snyderiae* با ویتامین C به روش حذف DPPH

نتایج غلظتی از عصاره که بتواند به میزان ۵۰٪ از رادیکال آزاد برداشت کند ( $EC_{50}$ ) برای

عصاره های متفاوت از جلبکهای مختلف محاسبه و در جدول شماره ۴-۱۸ به صورت میانگین و

انحراف معیار نمایش داده شده است . نتایج نشان می دهند که کمترین میزانی از عصاره که قادر

است حداقل ۵۰ درصد رادیکال آزاد DPPH را از محیط حذف کند مربوط به عصاره آبی جلبک

قرمز *K. alvarezii* با میانگین  $0.2 \pm 1$  mg/ml و پس از آن متعلق به عصاره آبی جلبک قرمز

*G.corticata* با میانگین  $0.1 \pm 1/2$  mg/ml و در رتبه سوم عصاره آبی جلبک قهوه ای

*S. angustifolium* با میانگین  $0.2 \pm 1.3$  mg/ml قرار داشت که این سه مورد با همدیگر اختلاف

معنی داری نداشتند ( $P < 0.05$ ) در حالیکه نسبت به نتایج سایر جلبکها دارای تفاوت معنی دار

بودند ( $P < 0.05$ ) (جدول ۴-۱۸). از طرفی بیشترین میانگین  $EC_{50}$  مربوط به عصاره متانولی

جلبک سبز *C. iyengarii* با مقدار  $12 \pm 1.25$  mg/ml بود که دارای تفاوت معنی دار با سایر

موارد بود ( $P < 0.05$ ). میانگین  $EC_{50}$  عصاره های مختلف جلبک سبز *C. iyengarii* در همه موارد

نسبت به سایر جلبکها بیشتر بود و به نظر می رسد دارای فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری نسبت به

سایرین باشد. میزان  $EC_{50}$  عصاره های آبی همه جلبکها نسبت به سایر عصاره های آلی هر جلبک

کمتر بود و این نتیجه برای همه جلبکها دارای تفاوت معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). میزان  $EC_{50}$  اسید

اکوریک (Vit. C) نیز  $0.006$  mg/ml بود که با همه گروهها تفاوت معنی دار داشت ( $P < 0.01$ ).

جدول ۴-۱۸: میزان  $EC_{50}$  عصاره های مختلف جلبکی برای حذف رادیکال  $DPPH^{\bullet}$  به mg/ml

جلبک	عصاره اتانولی	عصاره متانولی	عصاره کلروفرمی	عصاره آبی
<i>S. angustifolium</i>	$1.8 \pm 0.6^{ad}$	$1.7 \pm 0.3^{ea}$	$2 \pm 0.4^a$	$1.3 \pm 0.2^a$
<i>S. ilicifolium</i>	$5.5 \pm 0.4^b$	$6 \pm 0.33^b$	$4.1 \pm 0.3^b$	$3.5 \pm 0.5^b$
<i>C. iyengarii</i>	$11.1 \pm 1.3^c$	$12 \pm 1.25^c$	$11 \pm 0.8^c$	$10 \pm 0.5^c$
<i>K. alvarezii</i>	$2.1 \pm 0.28^a$	$2 \pm 0.4^a$	$2.2 \pm 0.3^a$	$1 \pm 0.2^a$
<i>G. corticata</i>	$1.3 \pm 0.2^d$	$1.4 \pm 0.3^e$	$1.4 \pm 0.25^d$	$1.2 \pm 0.1^a$
<i>L. Snyderia</i>	$7 \pm 1.1^b$	$2 \pm 0.25^a$	$6.2 \pm 0.8^e$	$1.8 \pm 0.2^e$
<i>P. borgesseni</i>	$10.5 \pm 1.1^c$	$9.5 \pm 0.65^d$	$9 \pm 0.5^f$	$8.8 \pm 0.7^d$
Vit. C	$0.006^g$ mg/ml			

\*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی دار بودن آماری نتیجه است.

#### د-نتایج LC<sub>50</sub> عصاره جلبکها بر ناپلی آرتمیا

به طور میانگین عصاره های کلروفرمی جلبکها نسبت به عصاره های الکلی (اتانولی و متانولی) در غلظت برابر سمیت بیشتری نسبت به ناپلی آرتمیا داشتند (جدول ۴-۱۹). بیشترین سمیت عصاره کلروفرمی جلبک *K. alvarezii* و کمترین سمیت عصاره اتانولی جلبک *G. corticata* با قدرت کشندگی ۵۰٪ ناپلی آرتمیا داشتند که به ترتیب در غلظتهای  $0.18 \pm 0.4$  و  $0.2 \pm 0.8$  باعث تلفات نیمی از جمعیت ناپلی آرتمیا طی ۲۴ ساعت می شدند و از نظر آماری نیز معنی دار بودند ( $P < 0.05$ ). سمیت عصاره های اتانولی و متانولی جلبکهای مختلف برای ناپلی آرتمیا متفاوت بودند، در بین عصاره های اتانولی، عصاره اتانولی جلبک *S. ilicifolium* بیشترین سمیت و عصاره اتانولی جلبک *G. corticata* کمترین سمیت داشتند. در بین عصاره های نیز بیشترین سمیت عصاره متانولی جلبک *S. ilicifolium* و کمترین سمیت عصاره اتانولی جلبک *G. corticata* داشتند که از نظر آماری با سایر تیمارها دارای تفاوت معنی دار بودند ( $P < 0.05$ ). با بررسی نتایج سمیت عصاره های مختلف (جدول ۴-۱۹) تصمیم به انتخاب عصاره اتانولی برای غنی سازی آرتمیا گرفته شد.

جدول ۴-۱۹: میزان LC<sub>50</sub>24 عصاره های مختلف جلبکی برای ناپلی آرتمیا بر حسب mg/ml

جلبک	عصاره اتانولی	عصاره متانولی	عصاره کلروفرمی
<i>S. angustifolium</i>	$0.13 \pm 0.8^a$	$0.3 \pm 0.9^a$	$0.23 \pm 0.5^a$
<i>S. ilicifolium</i>	$0.24 \pm 0.58^b$	$0.33 \pm 0.68^b$	$0.3 \pm 0.45^a$
<i>C. iyengarii</i>	$0.28 \pm 1.32^c$	$0.25 \pm 1.4^c$	$0.15 \pm 0.44^a$
<i>K. alvarezii</i>	$0.28 \pm 1.2^c$	$0.21 \pm 0.8^ab$	$0.18 \pm 0.4^a$

$1/1 \pm 0/25^c$	$2/3 \pm 0/32^d$	$3/8 \pm 0/2^d$	<i>G. corticata</i>
$0/73 \pm 0/23^b$	$1 \pm 0/25^{ac}$	$1/47 \pm 0/24^c$	<i>L. Snyderia</i>
$0/7 \pm 0/5^b$	$0/87 \pm 0/15^{ab}$	$1/5 \pm 1/1^c$	<i>P. borgesseni</i>

\*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی دار بودن آماری نتیجه است.

## ه- نتایج بار آلودگی

میزان بار آلودگی ویبریویی در بافت هموژن شده بچه میگوی سفید غربی در گروه کنترل منفی (بدون عصاره جلبک و بدون قرار گرفتن در معرض باکتری) در روز دهم پرورش CFU/g Tissue  $10^3 \times 0/02 \pm 0/2$  بود که در روزهای بیستم و سی ام پرورش با کمی افزایش به ترتیب به CFU/g Tissue  $10^3 \times 0/02 \pm 0/4$  و CFU/g Tissue  $10^3 \times 0/03 \pm 0/5$  رسید، این نتیجه نشان می دهد که باکتریهای *Vibrio spp.* به طور طبیعی در محیط پرورش میگوها (آب دریا) وجود دارد. بار آلودگی باکتریایی (*Vibrio spp.*) در گروه کنترل مثبت (بدون عصاره جلبک و با قرار گرفتن در معرض باکتری) در هر ۳ موقع نمونه گیری از همه گروهها بیشتر بود. این نتیجه نشان می دهد که همه عصاره ها توانسته اند میزان بار آلودگی باکتریایی در محیط را کاهش دهند. در گروههای تیمار معمولاً با افزایش غلظت عصاره جلبکها بار آلودگی باکتریایی کمتر شده است، هرچند این مطلب در همه موارد صدق نمی کند (جدول ۴-۲۰). در بین گروههای تیمار غلظت ۶۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره لورنسیا/سنیدریا توانسته بود بیشترین کاهش در بار باکتریایی ایجاد کند (CFU/g Tissue  $10^4 \times 0/03 \pm 0/6$ ) در حالیکه غلظت پایین همین عصاره کمترین قدرت در



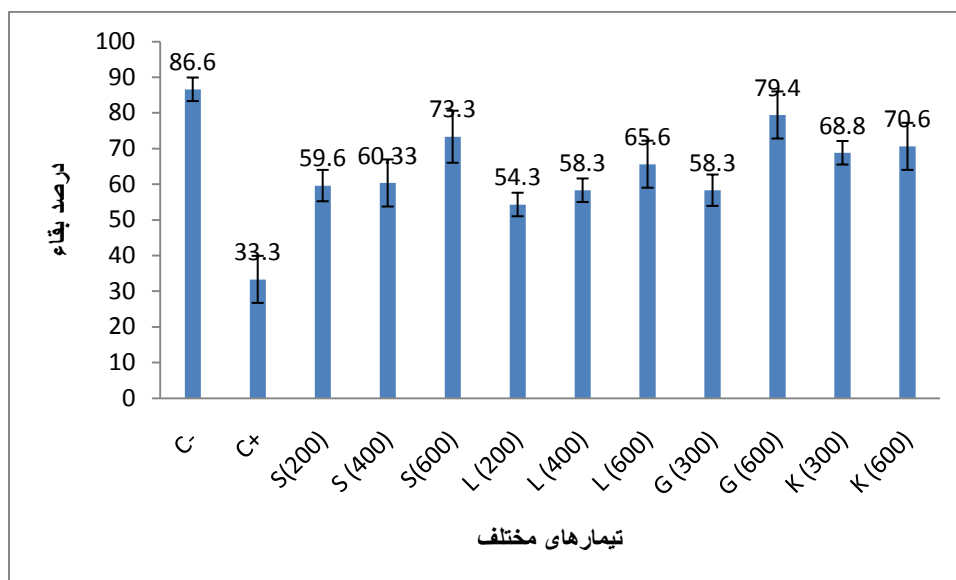
کاهش بار آلودگی باکتریایی داشت ( $0/5 \pm 0/01 \times 10^0$  CFU/g Tissue). میزان کاهش بار آلودگی باکتریایی توسط عصاره های اتانولی سایر جلبکها در مح دوده بین این دو عدد قرار گرفت که این نتایج در جدول ۴-۲۱ به صورت میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) ارائه شده است. همانطور که در جدول مذکور مشاهده می شود میزان بار آلودگی با افزایش روزهای پرورش تقریباً در تمام گروهها افزایش پیدا کرده است.

جدول ۴-۲۰: بار باکتریایی بر حسب  $g^{-1}$  CFU ( $\pm$  انحراف معیار) در بافت هموزن شده بچه میگوهای پرورش یافته در محیط فاقد یا واجد باکتری *V.harveyi* در فازهای مختلف دوره آزمایش.

گروه	روز ۱۰	روز ۲۰	روز ۳۰
C-	$0/2 \pm 0/02 \times 10^3$	$0/4 \pm 0/02 \times 10^3$	$0/5 \pm 0/03 \times 10^3$
C+	$3/2 \pm 0/06 \times 10^0$	$2/8 \pm 0/07 \times 10^0$	$3/4 \pm 0/05 \times 10^0$
S (۲۰۰)	$1/2 \pm 0/03 \times 10^4$	$1/5 \pm 0/07 \times 10^4$	$2/1 \pm 0/02 \times 10^4$
S (۴۰۰)	$1/4 \pm 0/05 \times 10^4$	$1/6 \pm 0/04 \times 10^4$	$1/7 \pm 0/03 \times 10^4$
S (۶۰۰)	$1/2 \pm 0/02 \times 10^4$	$1/5 \pm 0/05 \times 10^4$	$1/4 \pm 0/07 \times 10^4$
L (۲۰۰)	$0/5 \pm 0/01 \times 10^0$	$1/4 \pm 0/03 \times 10^4$	$3/2 \pm 0/02 \times 10^4$
L (۴۰۰)	$1/5 \pm 0/05 \times 10^4$	$2/3 \pm 0/03 \times 10^4$	$2/5 \pm 0/04 \times 10^4$
L (۶۰۰)	$0/6 \pm 0/03 \times 10^4$	$0/9 \pm 0/05 \times 10^4$	$2/1 \pm 0/06 \times 10^4$
G (۳۰۰)	$1/3 \pm 0/05 \times 10^4$	$1/8 \pm 0/03 \times 10^4$	$1/6 \pm 0/05 \times 10^4$
G (۶۰۰)	$0/7 \pm 0/02 \times 10^4$	$1/1 \pm 0/04 \times 10^4$	$1/5 \pm 0/05 \times 10^4$
K (۳۰۰)	$1/6 \pm 0/02 \times 10^4$	$1/4 \pm 0/04 \times 10^4$	$1/8 \pm 0/07 \times 10^4$
K (۶۰۰)	$0/3 \pm 0/01 \times 10^0$	$1/1 \pm 0/03 \times 10^4$	$1/9 \pm 0/05 \times 10^4$

## و-نتایج رشد و بازماندگی

بچه میگوهای سفید غربی (*L.vannamei*) تغذیه شده با آرتمیای غنی سازی نشده و پرورش یافته در محیط فاقد باکتری (C-) پس از ۳۰ روز پرورش دارای بیشترین درصد بقاء بودند ( $86.6 \pm 4.3\%$ ) که با سایر گروهها به جز گروه G (آرتمیای غنی سازی شده با غلظت ۶۰۰ میلی گرم در لیتر گراسیلاریا) دارای تفاوت معنی دار بود ( $P < 0.01$ )؛ اما میگوهای که از آرتمیای غنی سازی نشده استفاده کرده بودند و در محیط دارای باکتری *V.harveyi* قرار گرفته بودند (C+)، پس از ۳۰ روز پرورش دارای کمترین درصد بقاء بودند ( $33.3 \pm 6.6\%$ ) که این تفاوت با تمام گروهها از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0.01$ ). میگوهای پرورش یافته در آب دریای واجد باکتری *V.harveyi* و تغذیه شده با آرتمیای غنی سازی شده با غلظتهای مختلف عصاره های جلبک های مورد آزمون (*L. Snyderia*, *S. angustifolium* و *G. corticata* و *K. alvarezii*) همگی دارای درصد بقاء کمتر از کنترل منفی و بیشتر از کنترل مثبت بودند (نمودار ۱۲-۴) که اختلافهای آنها در برخی موارد معنی دار و بعضی غیر معنی دار بود ( $P < 0.05$ )، اما غلظتهای بالاتر هر جلبک در تمامی موارد از غلظتهای کمتر باعث افزایش بقاء بچه میگوها شده بود هر چند اختلافها به جز در مورد جلبک گراسیلاریا معنی دار نبود ( $P < 0.05$ ).



نمودار ۴-۱۲: درصد بقا بچه میگوهای سفید غربی تغذیه شده با آرتمیای غنی نشده و غنی شده با غلظتهای مختلف عصاره های اتانولی جلبک های مورد آزمون، پرورش یافته در محیط فاقد یا واجد باکتری *V.harveyi* پس از ۳۰ روز دوره پرورشی. بارها نشانگر انحراف معیار هستند.

بیشترین مقدار وزن کسب شده در بچه میگوها  $\text{C}^+$  دیده شد که علاوه بر غذای پایه از آرتمیای غنی سازی شده با غلظتهای مختلف عصاره اتانولی *گراسیلاریا کورتیکاتا* نیز استفاده کرده بودند که این تفاوت با همه گروهها به جز گروه کنترل منفی ( $\text{C}^-$ ) که با آرتمیای غنی سازی نشده تغذیه شده بودند و در معرض باکتری *V.harveyi* قرار نگرفته بودند، معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). کمترین وزن کسب شده نیز در بچه میگوهای بدست آمد که علاوه بر غذای پایه از آرتمیای غنی سازی شده با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره اتانولی جلبک *لورنسیا/سنیدریا* استفاده کرده بودند پس از آن گروه کنترل مثبت یعنی بچه میگوهای که فقط از غذای پایه به علاوه آرتمیای غنی نشده استفاده کرده بودند و در معرض باکتری قرار گرفته بودند ( $\text{C}^+$ ) کمترین وزن طی ۳۰ روز دوران پرورش بدست آوردند که این اختلاف بین دو گروه غیر معنی دار و با سایر گروهها

معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). عملکرد سایر عصاره ها بر روی پارامترهای رشد در جدول ۴-۲۱ آورده شده است.

جدول ۴-۲۱: طول و وزن اولیه، طول و وزن نهایی، وزن کسب شده و درصد نرخ رشد ویژه (SGR) در بچه میگوهای سفید غربی تغذیه شده با آرتمیای غنی نشده و غنی شده با عصاره اتانولی جلبک های مختلف، پرورش یافته در محیط فاقد یا واجد باکتری ویبریو هاروی

گروه	طول اولیه (cm)	وزن اولیه (mg)	طول نهایی (cm)	وزن نهایی (mg)	وزن کسب کرده (mg)	SGR%
کنترل منفی	$1.06 \pm 0.24^a$	$6.2 \pm 0.88^a$	$3.45 \pm 0.62^a$	$186 \pm 4.5^a$	$179.8 \pm 2.8^a$	$11.3 \pm 0.37^a$
کنترل مثبت	$1.06 \pm 0.24^a$	$6.2 \pm 0.88^a$	$2.38 \pm 0.54^b$	$121 \pm 6.4^b$	$113.8 \pm 4.3^b$	$9.90 \pm 0.24^b$
سارگاسوم (200mg/l)	$1.06 \pm 0.24^a$	$6.2 \pm 0.88^a$	$2.88 \pm 0.2^{ab}$	$166 \pm 3.8^c$	$159.4 \pm 3.1^c$	$10.9 \pm 0.34^c$
سارگاسوم (400mg/l)	$1.06 \pm 0.24^a$	$6.2 \pm 0.88^a$	$2.98 \pm 0.4^{ab}$	$173 \pm 5.3^c$	$166.8 \pm 3.9^d$	$11.1 \pm 0.22^c$
سارگاسوم (600mg/l)	$1.06 \pm 0.24^a$	$6.2 \pm 0.88^a$	$2.75 \pm 0.57^b$	$153 \pm 4.2^d$	$146.5 \pm 2.7^e$	$10.68 \pm 0.3^d$
لورنسینا (200mg/l)	$1.06 \pm 0.24^a$	$6.2 \pm 0.88^a$	$2.35 \pm 0.34^b$	$115 \pm 3.5^b$	$108.8 \pm 3.3^b$	$9.73 \pm 0.36^b$
لورنسینا (400mg/l)	$1.06 \pm 0.24^a$	$6.2 \pm 0.88^a$	$3.34 \pm 0.4^a$	$181 \pm 4.6^a$	$174.8 \pm 4.7^a$	$11.26 \pm 0.3^c$
لورنسینا (600mg/l)	$1.06 \pm 0.24^a$	$6.2 \pm 0.88^a$	$3.55 \pm 0.24^a$	$173 \pm 5.2^c$	$162.8 \pm 5.1^c$	$11.1 \pm 0.5^c$
گراسیلاریا (300mg/l)	$1.06 \pm 0.24^a$	$6.2 \pm 0.88^a$	$3.82 \pm 0.55^{ac}$	$195 \pm 5.8^e$	$184.8 \pm 3.9^g$	$11.5 \pm 0.4^a$
گراسیلاریا (600mg/l)	$1.06 \pm 0.24^a$	$6.2 \pm 0.88^a$	$3.80 \pm 0.32^{ac}$	$190 \pm 3.7^e$	$178.6 \pm 4.7^g$	$11.4 \pm 0.31^a$
کاپافیکوس (300mg/l)	$1.06 \pm 0.24^a$	$6.2 \pm 0.88^a$	$3.15 \pm 0.3^{ac}$	$153 \pm 4.9^d$	$146.8 \pm 4.5^e$	$10.7 \pm 0.23^d$
کاپافیکوس (600mg/l)	$1.06 \pm 0.24^a$	$6.2 \pm 0.88^a$	$3.92 \pm 0.43^a$	$145 \pm 3.8^d$	$138.8 \pm 3.7^e$	$10.5 \pm 0.15^d$

\*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی دار بودن آماری نتیجه است.

همان طور که در جدول ۴-۲۱ دیده می شود در مورد گراسیلاریا کورتیکاتا با افزایش

غلظت عصاره به دو برابر در میزان وزن کسب شده و همچنین نرخ ویژه رشد تغییری حاصل

نشده است در حالیکه در سایر موارد هر موقع غلظت عصاره ها از حدی بیشتر شده است (۴۰۰ میلی گرم در لیتر) باعث کاهش میزان رشد بچه میگوها شده است (جدول ۴-۲۰). گروههای تیماری به طور معنی داری کمتر بود ( $P < 0/05$ ).

نرخ رشد ویژه بچه میگوهای سفید غربی (*L.vannamei*) پرورش یافته نیز تابع میزان وزن کسب شده بود که به طور معنی داری عصاره های جلبک گراسیلاریا و گروه کنترل منفی که در محیط فاقد باکتری رشد کرده بودند پس از ۳۰ روز پرورش از همه گروهها بیشتر بود ( $P < 0/05$ ). از طرفی بچه میگوهای تغذیه شده با آرتمیای غنی سازی شده با غلظت ۲۰۰ میلی گرم جلبک لورنسیا و آرتمیای غنی نشده و پرورش یافته در محیط دارای باکتری (کنترل مثبت) دارای کمترین میزان نرخ رشد ویژه پس از ۳۰ روز دوره آزمایش بودند که این دو گروه فاقد تفاوت معنی دار با هم و با سایر گروهها دارای تفاوت معنی دار آماری بودند ( $P < 0/05$ ).

### ز- نتایج آزمونهای چالنج با باکتری *V.harveyi*

تلفات تجمعی میگوهای تیمار و شاهد در جدول ۴-۲۲ نشان داده شده است. همانطور که دیده می شود گروه کنترل منفی که با باکتری چالنج داده نشده بود هیچ تلفاتی نداشت. در مقابل گروه کنترل مثبت که بدون درمان در معرض باکتری قرار گرفته بود دارای بیشترین میزان تلفات بود (۹۲/۸۵٪). همه میگوهایی که با دزهای مختلف عصاره اتانولی جلبکهای دریایی انتخاب شده تغذیه شده بودند در موا جهه با باکتری *V.harveyi* درصد تلفات کمتری نسبت به گروه کنترل مثبت داشتند. کمترین میزان تلفات در گروههایی که در معرض باکتری قرار گرفته بودند، مربوط به گروه  $G(600)$  با ۲۷/۵ درصد بود. میزان تلفات در سایر گروهها مابین این

اعداد قرار داشتند (جدول ۴-۲۲). این نتایج نشان می دهد که میزان تلفات در گروههایی که از دزهای بالاتر عصاره های مختلف استفاده کرده اند در مواجهه با باکتری پاتوژن، کمتر بوده است . همچنین درصد محافظت کنندگی نسبی که فاکتور مهمتری است در تمام مواردی که دز عصاره یک جلبک بیشتر شده است، افزایش پیدا کرده هر چند که افزایش نسبی وابسته به دز در تمام موارد یکسان نیست (جدول ۴-۲۲ و نمودار ۴-۱۷).

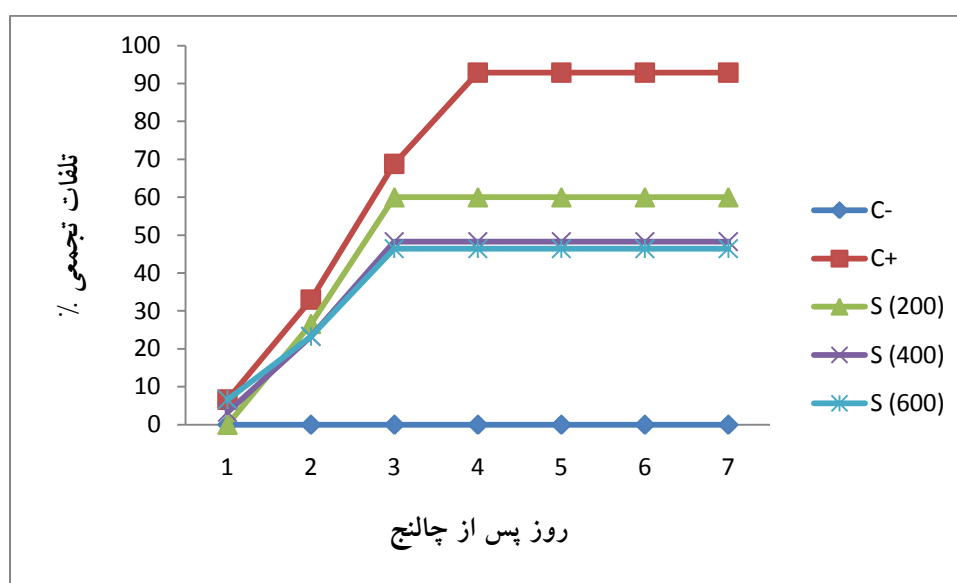
جدول ۴-۲۲: تلفات تجمعی و درصد محافظت کنندگی عصاره اتانولی جلبکهای مختلف و گروههای

شاهد در مواجهه با باکتری ویبریو هاروی

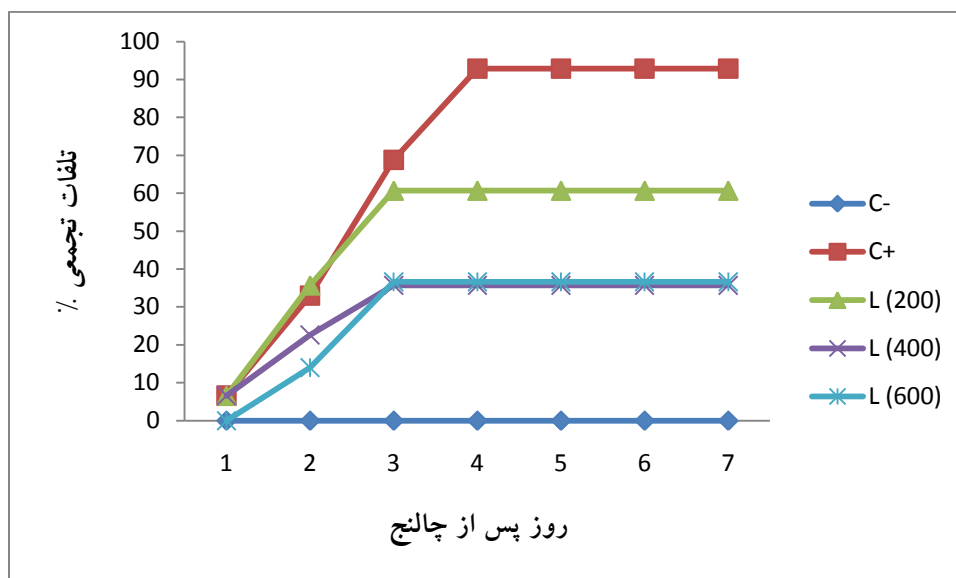
گروه	تعداد بچه میگو (عدد)	تلفات روز اول (عدد)	تلفات تجمعی پس از ۷ روز (عدد)	تلفات %	%PRP
C+	۳۰	۲	۲۷	۹۲/۸۵	-
C-	۳۰	۲	۲	-	-
S(۲۰۰)	۳۰	۰	۱۸	۶۰	۳۵/۳۷
S(۴۰۰)	۳۰	۱	۱۵	۴۸/۲۷	۴۸
S(۶۰۰)	۳۰	۲	۱۵	۴۶/۴۲	۵۰
L(۲۰۰)	۳۰	۲	۱۹	۶۰/۷	۳۴/۶
L(۴۰۰)	۳۰	۲	۱۲	۳۵/۷	۶۱/۵
L(۶۰۰)	۳۰	۰	۱۱	۳۶/۶	۶۰/۵
G(۳۰۰)	۳۰	۰	۹	۳۰	۶۷/۶
G(۶۰۰)	۳۰	۱	۹	۲۷/۵	۷۰/۳۸
K(۳۰۰)	۳۰	۰	۱۵	۵۰	۴۶/۱۴

۶۲/۸۶	۳۴/۴۸	۱۱	۱	۳۰	K (۶۰۰)
-------	-------	----	---	----	---------

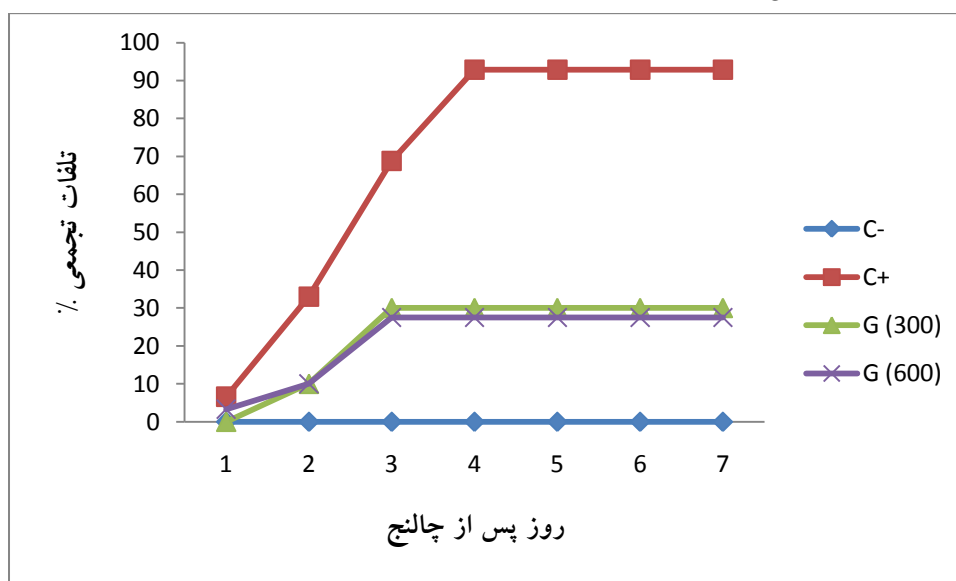
نمودارهای ۴-۱۳ تا ۴-۱۶ تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذیه با غذای پایه (کنترل منفی C- و کنترل مثبت C+) یا غذای پایه به اضافه آرتمیای غنی سازی شده با غلظت‌های مختلف جلبکهای مورد آزمون به صورت واضح و طی یک هفته نشان می دهند. همانطور که مشاهده می شود کلیه عصاره های جلبکی موجب کاهش تلفات در برابر دز کشنده باکتری ویبریو هاروی شده اند.



نمودار ۴-۱۳: تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذیه با غذای پایه (کنترل منفی C- و کنترل مثبت C+) یا غذای پایه به اضافه آرتمیای غنی سازی شده به وسیله عصاره اتانولی جلبک *S.angustifolium* با دزهای مختلف (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ mg/l)

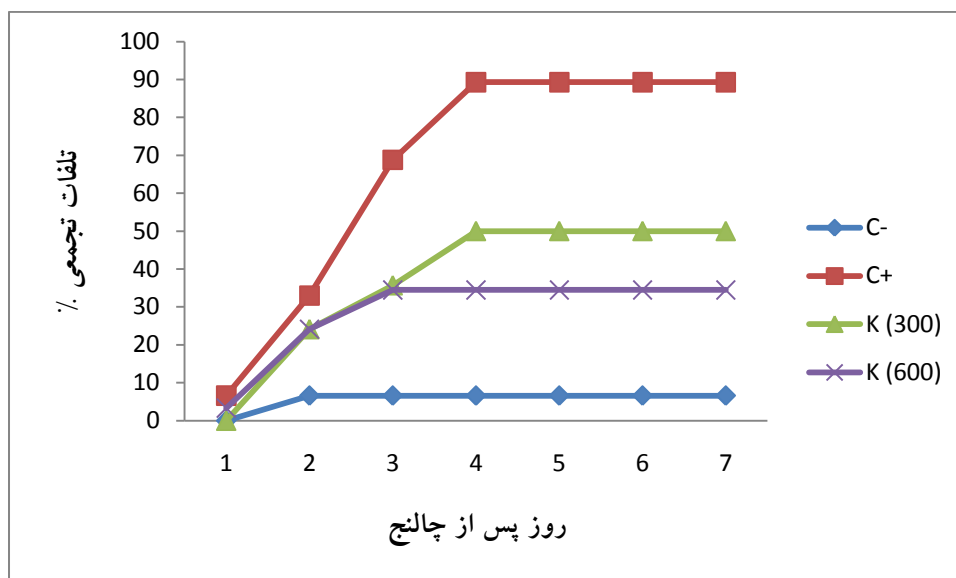


نمودار ۴- ۱۴: تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذیه با غذای پایه (کنترل منفی C- و کنترل مثبت C+) یا غذای پایه به اضافه آرتمیای غنی سازی شده به وسیله عصاره اتانولی جلبک *L.snyderiae* با دزهای مختلف (۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ mg/l)



نمودار ۴- ۱۵: تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذیه با غذای پایه (کنترل منفی C- و کنترل مثبت C+) یا غذای پایه به اضافه آرتمیای غنی سازی شده به وسیله عصاره اتانولی جلبک *G.corticata* با دزهای مختلف (۳۰۰ و ۶۰۰ mg/l)

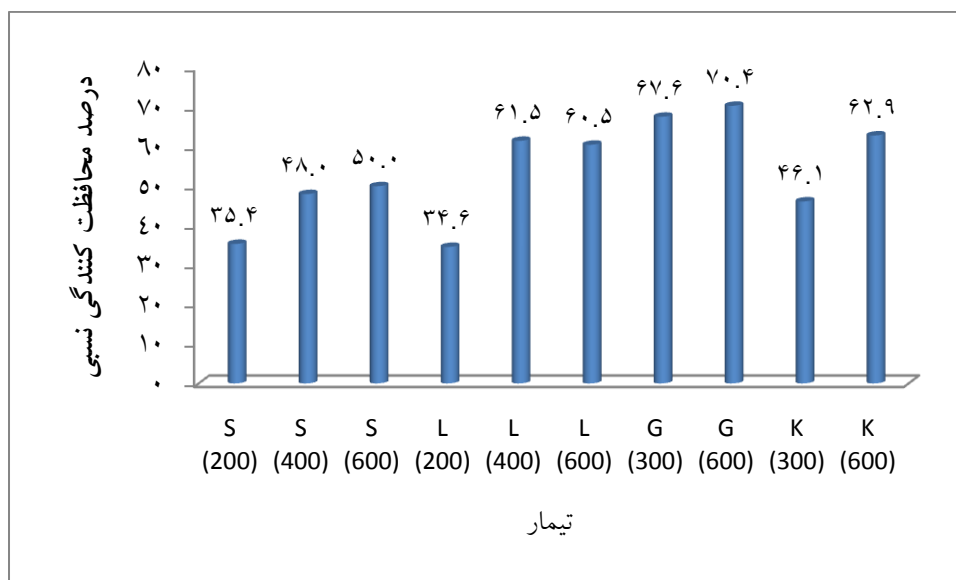




نمودار ۴-۱۶: تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذیه با غذای پایه (کنترل منفی C- و کنترل مثبت C+) یا غذای پایه به اضافه آرتمیای غنی سازی شده به وسیله عصاره اتانولی جلبک *K.alvarezii* با دزهای مختلف (۶۰۰ و ۳۰۰ mg/l)

نمودار ۴-۱۷ درصد محافظت کنندگی عصاره های اتانولی جلبکهای انتخاب شده با

غلظتهای مختلف در برابر باکتری پاتوژن میگو (*V.harveyi*) را نشان می دهد، همانطور که مشاهده می شود دز ۶۰۰mg/l جلبک قرمز *گراسیلاریا کورتیکاتا* با ۷۰/۳۸ درصد بیشترین قدرت محافظت کنندگی بچه میگوها در برابر باکتری مذکور داشت و پس از آن دز ۳۰۰mg/l همین جلبک و دز ۶۰۰mg/l عصاره اتانولی جلبک *K.alvarezii* با میزان محافظت کنندگی به ترتیب ۶۷/۵ و ۶۲/۸۶ درصد قرار داشتند و کمترین میزان محافظت کنندگی مربوط به دز پایین *L. Snyderiae* با ۳۴/۶٪ و دز پایین جلبک *S.angustifolium* با ۳۵/۳۷٪ بود.



نمودار ۴-۱۷: درصد محافظت کنندگی غلظتهای مختلف عصاره های اتانولی جلبکهای مورد آزمون در

برابر باکتری *V.harveyi*

## فصل پنجم

### بحث و نتیجه گیری

## الف- فعالیت ضدباکتریایی

محیطهای اقیانوسی و دریایی یک پتانسیل بسیار مهم به منظور کشف ترکیباتی هستند که قادرند علیه بسیاری از انگلها و بیماریهای عفونی موثر باشند (Devienne و همکاران، ۲۰۰۲). در این مطالعه عصاره های خام اتانولی، متانولی، کلروفرمی و آبی ۷ جلبک دریایی مختلف جداسازی شده از آبها و سواحل خلیج فارس به منظور فعالیت ضدباکتریایی مورد ارزیابی قرار گرفت . در این مطالعه تقریباً همه جلبکهای مورد آزمون اثرات ضدباکتریایی از خود نشان دادند و حداقل رشد تعدادی از باکتریهای م ورد آزمایش را مهار کردند . از میان ۲۸ عصاره بدست آمده عصاره اتانولی جلبک های قرمز *G.corticata* و *L. snyderiae* بیشترین اثر مهار کنندگی بر پاتوژن میگو *V.harveyi* داشتند حتی این میزان بازدارندگی از آنتی بیوتیک استاندارد اکسی تتراسایکلین نیز بیشتر بود. به نظر می رسد جلبکهای قرمز نسبت به جلبکهای قهوه ای و سبز اثرات ضدباکتریایی قوی تری داشته باشند . در مطالعات مشابه در پژوهشی که روی فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی بیوتیکی سه گونه از جلبکهای کانال سوئز انجام شد، جلبک قرمز *L.papilosa* بیشترین اثرات ضد باکتریایی نسبت به سایر جلبکها نشان داد (Shanab، ۲۰۰۷). در تحقیق دیگری که روی ۸۲ گونه از جلبکهای پرسلولی سواحل مدیترانه ای اسپانیا انجام شده است، مشخص شد جلبک های قرمز نسبت جلبکها های قهوه ای و سبز دارای بیشترین اثرات ضدباکتریایی بودند (Salvador و همکاران، ۲۰۰۷). در پروژه بزرگ تحقیقاتی که روی ۱۵۱ گونه از جلبکهای دریایی سواحل انگلستان انجام شد نیز تعیین گردید که تمامی جلبکهای قرمز مورد آزمون دارای اثرات

ضدباکتریایی قابل ملاحظه بر باکتریهای تست شده داشتند (Hornsey و Hide، ۱۹۷۴). همچنین در مطالعه دیگری نیز دیده شده جلبک قرمز *L.Snyderiae* نمونه برداری شده از سواحل استان بوشهر نسبت به جلبک قهوه ای *S.angustifolium* اثرات ضدباکتریایی بیشتری دارد (درخشش و همکاران، ۱۳۹۰). در تحقیقی فعالیت ضدباکتریایی ۵ عصاره اتانولی، متانولی، استونی، کلروفرمی و اتیل استات از دو جلبک دریایی قرمز *K.alvarezii* و جلبک سبز *U.lactuta* بر روی تعدادی از باکتریهای پاتوژن انسانی مورد بررسی قرار گرفت، فعالیت ضدباکتریایی جلبک قرمز *K.alvarezii* بسیار زیاد و قابل مقایسه با جلبک *U.lactuta* نبود، همچنین در این مطالعه بیشترین فعالیت مربوط به عصاره متانولی و کمترین فعالیت مربوط به عصاره بدست آمده از حلال اتیل استات بود (Pushparaj و همکاران، ۲۰۱۴). در حالیکه به نظر می رسد، در مطالعه حاضر بیشترین فعالیت ضدباکتریایی مربوط عصاره کلروفرمی باشد. به هر حال بسیاری از جلبکهای دریایی در سواحل جهان جهت اثرات ضدباکتریایی مورد آزمون قرار گرفته اند که در تعداد زیادی از آنها مشخص شده جلبکهای قرمز دارای اثرات ضدباکتریایی بیشتری نسبت به سایر جلبکها می باشند (Rao و Parekh، ۱۹۸۱؛ Reichelt و Borowitzka، ۱۹۸۴). هر چند در برخی مطالعات دیگر نیز نتایج متضادی بدست آمده است برای مثال در یک مطالعه که عصاره ها ی متانولی ۸ جلبک دریایی مختلف از سواحل هندوستان مورد بررسی قرار گرفته است، مشاهده شد جلبک سبز *Cladophra glomerata* دارای بیشترین اثر مهار کنندگی نسبت به جلبکهای قهوه ای و قرمز بر باکتریهای پاتوژن ماهی می باشد (Yuvaraj و همکاران، ۲۰۱۱). یا اینکه در تحقیق دیگری بیان شده بود از میان جلبکهای مختلف جلبک سبز *Ulva lactuta* دارای بیشترین اثر ضدباکتریایی علیه باکتری

*S.aureus* بود (Kandhasamy و Arrunchalam، ۲۰۰۸). در هر صورت در این مطالعه مشخص شد جلبکهای قرمز دارای اثرات ضدباکتریایی قویتری نسبت به جلبکهای سبز و قهوه ای هستند. از طرفی به نظر می رسد جلبکها دارای اثرات شدیدتری بر باکتریهای گرم مثبت نسبت به باکتریهای گرم منفی باشند به طوریکه در این مطالعه حداقل یک عصاره از هر جلبک بر باکتریهای گرم مثبت آزمون شده اثرات ضدباکتریایی داشتند. این مورد در گزارشات دیگری نیز دیده شده است (Taskin و همکاران، ۲۰۰۱؛ Tuney و همکاران، ۲۰۰۶). این اثر بیشتر بر باکتریهای گرم مثبت ممکن است به خاطر وجود دیواره سلولی پیچیده در باکتریهای گرم منفی و عدم وجود این دیواره سلولی در گرم مثبتها باشد (Pesando و Caram، ۱۹۸۴؛ Valchos و همکاران، ۱۹۹۷). علاوه بر این وجود مقاومت باکتریها در برابر عصاره های جلبکی ممکن است به دلیل حضور برخی ترکیبات یا فاکتورهای مهار کننده در عصاره ها باشد (Sastry و Rao، ۱۹۹۴).

در این پژوهش کمترین غلظتی از عصاره که موجب مهار رشد باکتری شده بود (MIC) ۰/۲۵mg/ml که مربوط به جلبک قرمز *L.snyderiae* و *P. borgesseni* و بر روی باکتری *B.subtilis* و بیشترین آن ۳۲mg/ml در مورد عصاره اتانولی جلبک قرمز *K.alvarezii* و بر روی باکتری *V.alginolyticus* بدست آمد. در مطالعات قبلی گزارش شده که غلظت ۰/۷۵μg/ml عصاره متانولی جلبک سبز *C.glomerata* باعث مهار رشد باکتریهای *B.cereus* و *S.aureus* شده است (Yuvaraj و همکاران، ۲۰۱۱). در مورد جلبک قرمز *L.snyderia* نمونه گیری شده از سواحل شهر بوشهر نیز کمترین غلظتی که باعث مهار رشد یک باکتری شده بود ۳/۷۵ mg/ml در مورد باکتری *S.typhi* بود و بیشترین غلظت مربوط به مهار باکتری *S.salivaris* با ۱۵mg/ml بود

درخشش و همکاران، ۱۳۹۰. در تحقیق دیگری حداقل غلظت بازدارنده رشد جلبک سبز *U. lactuta* برای باکتری *S.aureus* برابر  $200 \mu\text{g/ml}$  ذکر شده است (Kandhasamy و Arrunchalam، ۲۰۰۸). در پژوهش دیگری میزان MIC جلبک *S.latifolium* برای ویبریو هاروی جداسازی شده از میگوهای تلف شده در مراکز تکثیر استان بوشهر  $10 \text{mg/ml}$  محاسبه شده بود (Dashtiannasab و همکاران، ۲۰۱۲). گزارشهای متفاوت و گاه متضاد در اثرات ضدباکتریایی جلبکهای یکسان حتی بر روی باکتریهای متفاوت و یا یکسان دیده می شود که وابسته به اختلاف فصل نمونه گیری جلبکها، روش عصاره گیری، حلالهای ارگانیک مورد استفاده و روشهای ارزیابی می باشد. مواد فعال زیستی فراوانی در جلبکهای دریایی وجود دارند که می توانند باعث اثرات ضد میکروبی جلبکها باشند، از مهمترین ترکیبات جلبکهای دریایی که دارای خواص ضد باکتریایی می باشند می توان به آلزیناتها اشاره کرد که جزء پلی ساکاریدهای گیاهان دریایی محسوب شده و در گیاهان خشکی وجود ندارند، آنها در جلبکهای قهوه ای تا ۴۷٪ وزن خشک می توانند وجود داشته باشند، اما بیشترین حضور در جلبکهای قرمز دارند (Holdt و Kraan، ۲۰۱۱). آلزیناتها می توانند به اشکال اسیدی و نمکی یافت شوند، شکل اسیدی آن به اسم اسید آلزینیک شناخته می شود که علاوه بر خواص سخت کنندگی، قوام دهندگی، نگهدارندگی (خواص عمومی کلویدها)، دارای خواص قوی ضدباکتریایی و ضد التهابی نیز هستند (Andriamanantoanina و همکاران، ۲۰۱۰).

از ترکیبات دیگری که خاصیت ضدباکتریایی دارند برخی از پروتئینهای مهمی است که فعالیت زیستی دارند و از میان این پروتئین های جداسازی شده از جلبکهای پرسلولی می توان به

لکترین ها اشاره کرد که به کربوهیدراتها باند می شوند و در بسیاری از مراحل بیولوژیک مثل ارتباطات درون سلولی شرکت دارند. آنها علاوه بر خواص ضدباکتریایی، دارای خواص ضد ویروسی و ضد التهابی نیز می باشند می باشند (Cunningham و همکاران، ۲۰۱۰) و یکی از مهمترین موادی هستند که باعث تحریک سیستم ایمنی میگوها می شوند (دشتیان نسب و همکاران، ۱۳۸۸).

جلبکهای دریایی همچنین دارای مقادیر قابل توجهی اسیدهای چرب امگا ۳ می باشند که دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی می باشند (Pulz و Gross، ۲۰۰۴؛ Plaza و همکاران، ۲۰۱۰). در یک پژوهش دیده شده عصاره لیپیدی جلبک *Gracillariopsis longissima* که حاوی سطوح معنی داری از اسیدهای چرب امگا ۳ بود دارای خواص ضدباکتریایی علیه پاتوژنهای آبزیان می باشد، لذا از این عصاره به عنوان مکمل غذای ماهیان پیشنهاد شده است (Stabili و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین مشخص شده است که ساختارهای دیگری نیز در اسیدهای چرب موجود در جلبکهای دریایی شامل گلیکولیپیدها، استروئیدها، اسیدهای فنولیک، ترپنوئیدها، اسید لوریک، اسید پالمیتیک، اسید لینولئیک، اسید اولئیک و اسید استئاریک نیز دارای خواص و پتانسیل آنتی بیوتیکی هستند (Youngsblood و همکاران، ۱۹۷۱).

یکی از مهمترین عواملی که در جلبکهای دریایی وجود دارند و دارای خواص آنتی میکروبی هستند، پلی فنولها می باشند که علاوه بر خواص آنتی اکسیدانی قوی دارای خواص آنتی



میکروبی نیز می باشند (Gupta و Abu-Ghannam، ۲۰۱۱). از میان پلی فنولها، فلوروتانن<sup>۱</sup> مهمترین عامل آنتی باکتریایی است که فقط در گیاهان دریایی وجود دارد (Li و همکاران، ۲۰۱۱) با توجه به ممنوع بودن استفاده از آنتی بیوتیک ها در مراحل تکثیر و پرورش آبزیان شامل ماهی و میگو، لازم است که روشهای جایگزین یا مواد جدید برای کنترل بیماریهای عفونی آبزیان مشخص شود. تاکنون مشخص شده است که حداقل برخی از سویه های *V.harveyi* جداسازی شده از مراکز تکثیر استان بوشهر نسبت به برخی آنتی بیوتیکها مقاوم هستند (مقیم و همکاران، ۱۳۹۲). هم اکنون کنترل این پاتوژنها توسط برخی باکتریهای پروبیوتیک یا سایر ترکیبات فعال زیستی امکان پذیر شده است (Rengpipat و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج این مطالعه نیز یک گزینه دیگر یعنی عصاره های ارگانیک جلبک های دریایی برای درمان این پاتوژنها پیشنهاد می دهد هر چند برای اثبات کامل و جزییات استفاده نیاز به مطالعات بیشتری است.

## ب- فعالیت آنتی اکسیدانی

رادیکالهای آزاد مولکولهای بیش فعالی هستند که یک الکترون منفرد در مدار خارجی خود دارند که در این حالت به شدت واکنش پذیر و بی ثبات می باشند. رادیکالهای آزاد معمولاً از طریق انرژی تابشی (اشعه UV و X) یا در اثر واکنش های شیمیایی انجام شده طی فرآیندهای متابولیسم طبیعی در بدن ایجاد می گردند. رادیکالهای آزاد سر منشا واکنش زنجیره ای تخریب و فروپاشی غشای سلولی و ترکیبات درون سلولها از قبیل چربیها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک

---

<sup>1</sup> Phlorotannins

هستند. علاوه بر تخریب سلولها، مهمترین عامل اکسیداسیون چربیها نیز می باشند و از این طریق باعث فساد و بوی نامطبوع مواد غذایی می گردند . از اینرو استفاده از یک آنتی اکسیدان ممکن است اثرات درمانی و تازه ماندن تولیدات غذایی شود، از طرفی ترکیبات آنتی اکسیدانی با خنثی کردن و حذف رادیکالهای آزاد مثل هیدروپراکسیدها و پیروکسیل های چربی باعث کاهش استرس اکسیداتیو در سلولها شده و از این طریق از بیماریهای مرتبط با استرس اکسیداتیو در موجودات زنده پیشگیری کنند (Stirk و Van Staden، ۱۹۹۷). بسیاری از آنتی اکسیدانهای مصنوعی، اثرات سمی و جهش زا<sup>۱</sup> نشان داده اند که این امر باعث تغییر جهت به سمت استفاده از آنتی اکسیدانهای طبیعی شده است (Khan و همکاران، ۲۰۰۹). با توجه به تشخیص خواص آنتی اکسیدانی در بسیاری از جلبکهای دریایی (Khan و همکاران، ۲۰۰۹) پژوهش و کار شناسایی آنتی اکسیدانها از گیاهان دارویی و جلبکهای دریایی از عرصه هایی است که سریعاً رشد کرده است . سالانه تعداد زیادی از این گیاهان خشکی و دریایی به منظور ارزیابی پتانسیل آنتی اکسیدانی و با روشهای بسیار متنوع مورد بررسی قرار می گیرند.

DPPH یک رادیکال آزاد با نیتروژن پایدار در مرکز است که به طور موثری توسط آنتی اکسیدانها قابل برداشت می باشد (MacKinnon و همکاران، ۲۰۱۰). از اینرو آزمون DPPH به عنوان یک روش سریع، قابل اعتماد و ارزان، فراوانی برای ارزیابی پتانسیل آنتی اکسیدانی ترکیبات طبیعی شامل عصاره های گیاهی و جلبکهای دریایی مورد استفاده قرار می گیرد (Molyneux،

---

<sup>1</sup> motagenic

۲۰۰۴). آزمون DPPH همچنین یک روش خوب و کارا برای بررسی برداشت رادیکالهای

پراکسیل است (Stabili و همکاران، ۲۰۱۲).

در این مطالعه توانایی عصاره های مختلف جلبکهای مورد آزمون در حذف و ب برداشت رادیکال آزاد DPPH با کاهش جذب نوری در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شد . نتایج نشان داد، همه جلبکهای دریایی مورد آزمون و جداسازی شده از سواحل خلیج فارس دارای پتانسیل آنتی اکسیدانی از طریق حذف رادیکالهای آزاد می باشند. در این پژوهش بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در بین عصاره ها مربوط به عصاره آبی آنها بود که با مطالعات دیگر نیز مطابقت دارد (Ismaeil و Hong، ۲۰۰۲)، جایی که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های آبی و اتانولی ۴ جلبک دریایی خوراکی (به نامهای تجاری <sup>۱</sup>Nori، <sup>۲</sup>Kumbu، <sup>۳</sup>Wakame و <sup>۴</sup>Hijki) خریداری شده از سوپ مارکتی در مالزی با هم مقایسه شد و نتایج نشان داد عصاره آبی همه جلبکها نسبت به عصاره اتانولی آنها اثرات آنتی اکسیدانی قویتری دارند . یا در مطالعه دیگری که عصاره آبی جلبک قهوه ای *Himathalia elongata* جداسازی شده از سواحل ایرلند نسبت به عصاره متانولی همان جلبک دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قویتری بوده است (Rajauria و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی جلبک قهوه ای *S. boveanum* جداسازی شده از سواحل استان بوشهر دیده شده بود که عصاره آبی جلبک مذکور حدود ۱۰ برابر اثر آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره اتانولی آن دارد (Rastian و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین در این

---

<sup>1</sup> *Prophyra* sp.

<sup>2</sup> *Laminaria* sp.

<sup>3</sup> *Undaria* sp.

<sup>4</sup> *Hijikia* sp.

مطالعه دیده شد پس از عصاره های آبی در اکثر موارد عصاره های متانولی و اتانولی اثرات آنتی اکسیدانی قویتری داشتند و در بیشتر مواقع اثر آنتی اکسیدانی عصاره های کلروفرمی از بقیه عصاره ها کمتر بود. برخی پژوهشگران دلیل آنرا به میزان قطبیت حلال وابسته می دانند (Zhou و Yu, ۲۰۰۴) که در حلالهای قطبی متابولیت‌های موثرتری از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی استخراج می شوند. در برخی موارد هم گزارش شده که بر عکس عصاره های جلبکی بدست آمده در حلالهای غیر قطبی مثل اتیل استات<sup>۱</sup> و هگزان<sup>۲</sup> اثرات آنتی اکسیدانی موثرتری نسبت به عصاره های جلبکی بدست آمده در از حلالهای قطبی مثل اتانول داشتند (Indu و Seenivasan, ۲۰۱۳).

از طرفی در غلظت ۲ mg/ml عصاره های مختلف، عصاره آبی جلبک قرمز *G.corticata* با  $75 \pm 6\%$  بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی نسبت به سایر جلبکهای مورد آزمون از خود نشان داد و پس از آن عصاره آبی جلبک قهوه ای *S.angustifolium* با مهار  $69 \pm 4\%$  رادیکال آزاد در رتبه دوم قرار داشت هرچند که اختلاف آماری وجود نداشت. در پژوهش قبلی عصاره آبی *S.boveanum* در غلظت ۳ mg/ml توانسته بود ۹۴٪ فعالیت رادیکال آزاد DPPH را مهار کند (Rastian و همکاران، ۲۰۰۷) و این عدد تا غلظت ۱۰ mg/ml ثابت باقی مانده بود در حالیکه عصاره آبی جلبکهای *G.corticata* و *S.angustifolium* در غلظت ۸ mg/ml توانسته بودند تا ۹۸٪ فعالیت رادیکال آزاد DPPH را مهار کنند، سایر جلبکها همانطور که در نمودارهای ۴-۱ تا ۴-۴ دیده شد فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری داشتند. فعالیت برداشت رادیکال آزاد سایر عصاره های جلبکهای مورد مطالعه کمتر از عصاره آبی آنها بود که البته میزان آنها نیز قابل توجه بود مثلاً

---

<sup>1</sup> Ethyl asetate

<sup>2</sup> Hexan

عصاره متانولی جلبکهای *G.corticata* و *S.angustifolium* در غلظت ۲ mg/ml توانسته بودند به ترتیب ۵٪ ± ۰.۷۲٪ و ۳٪ ± ۰.۵۸٪ از رادیکال آزاد را حذف کنند که در مقایسه با مطالعات قدرت آنتی اکسیدانی خوبی محسوب می شود . در پژوهشی در هند عصاره های اتانولی جلبکهای *S.wihgtii*، *Gratolupia litophilila* و *Chaetomorpha linum* با غلظت ۱mg/ml بترتیب ۰.۷۲٪، ۵۲٪ و ۴۱٪ باعث مهار رادیکال آزاد DPPH شده بودند (Indu و Seenivasan، ۲۰۱۳).

گزارشهای زیادی در مقایسه اثرات آنتی اکسیدانی گروههای مختلف جلبکها وجود ندارد؛ اما در برخی از این بررسیها نتایج متفاوتی داشته است، چندین بررسی نشان داده اند که جلبکهای قهوه ای آنتی اکسیدانهای قویتری نسبت به جلبکهای قرمز می باشند (Sachindra و همکاران، ۲۰۰۷؛ Matsukawa و همکاران، ۱۹۹۷) برخی از مطالعات نیز اثر آنتی اکسیدانی جلبکهای قرمز را نسبت به سایر جلبکها بیشتر گزارش کرده اند (Anggadiredjal و همکاران، ۱۹۹۷؛ Ismaeil و Hong، ۲۰۰۲). عده ای هم اعلام کرده اند، جلبکهای سبز اثرات آنتی اکسیدانی قویتری نسبت به سایر گروهها داشته اند (Mayalen و همکاران، ۲۰۰۷). ولی در این مطالعه جلبک سبز *C.iyengarrii* کمترین اثر آنتی اکسیدانی نسبت به سایر جلبکهای قرمز و قهوه ای داشت همانطور که در پژوهشی بر روی خواص آنتی اکسیدانی جلبکهای جداسازی شده از سواحل اقیانوس هند دیده شده بود (Indu و Seenivasan، ۲۰۱۳). جلبک های سبز پس از جلبکهای قرمز کمترین اثر آنتی اکسیدانی داشتند و جلبکهای قهوه ای خواص آنتی اکسیدانی بیشتری داشتند.

همچنین در این پژوهش دیده شد، با افزایش غلظت فعالیت آنتی اکسیدانی در همه عصاره های جلبکی و آنتی اکسیدان استاندارد (ویتامین C) فعالیت آنتی اکسیدانی به طور معنی

داری افزایش پیدا می کند که با تحقیقات پیشین مطابقت داشت (Yu و Zhou، ۲۰۰۴؛ Ismaeil و Hong، ۲۰۰۲).

نتایج  $EC_{50}$  عصاره های مختلف جلبکی نشان می دهد چه مقدار غلظتی از عصاره لازم است تا ۵۰٪ رادیکال آزاد حذف شود و هر چه مقدار آن کمتر باشد بیانگر قدرت آنتی اکسیدانی بیشتر است. در این مطالعه کمترین غلظتی از عصاره ها که توانسته بود نیمی از رادیکال آزاد DPPH را از محیط حذف کند مربوط به عصاره های آبی جلبک های به ترتیب *K.alvarezii*، *G.cortiacata*، *S.angustifolium*، *L.snydriae*، *S.ilicium*، *P.borgesseni* و در آخر جلبک سبز *C.iyengarii* بود که به نظر می رسد بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در این مطالعه مربوط به جلبکهای قرمز و کمترین آن مربوط به جلبک های سبز باشد. در این مطالعه کمترین غلظتی از عصاره جلبکی که توانسته نیمی از رادیکال آزاد DPPH را برداشت کند متعلق به عصاره آبی جلبک قرمز *K.alvarezii* بود و برابر با  $1 \pm 0.2 \text{ mg/ml}$  بود و پس از آن نیز جلبک قرمز *G.cortiacata* با  $1 \pm 0.1 \text{ mg/ml}$  بود، در پژوهشهای پیشین  $EC_{50}$  عصاره متانولی جلبکهای *G.cornea* و *G.birdiae* جداسازی شده از سواحل برزیل به ترتیب  $0.76$  و  $0.77$  میلیگرم در میلی لیتر بدست آمده بود (Bartolomeo و همکاران، ۲۰۱۱).  $EC_{50}$  عصاره های اتانولی و متانولی جلبک قرمز *K.alvarezii* جداسازی شده از سواحل اقیانوس هند به ترتیب برابر  $3/03$  و  $4/28$  میلی گرم در میلی لیتر محاسبه شده بود (Kumar و همکاران، ۲۰۰۸). در حالیکه بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی جلبکهای خوراکی سواحل ایرلند نیز بررسی شده است (Cox و همکاران، ۲۰۱۰). در این مطالعه مشخص شد عصاره خشک متانولی جلبک قهوه ای *Laminaria digitata* در بین

سایر عصاره ها به طور معنی داری دارای میزان ترکیبات فنلی و همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری برای برداشت رادیکال آزاد مولکول DPPH می باشد به طوریکه غلظت برداشت ۵۰٪ رادیکال آزاد (EC<sub>50</sub>) عصاره متانولی ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بود . در تحقیق دیگری نیز EC<sub>50</sub> عصاره آبی - متانولی جلبک *Hemanthalia elongate*، معادل ۰/۵۷ پی پی ام بدست آمد (Rajauria و همکاران، ۲۰۱۲) که این ارقام پایین نشان می دهد، جلبکهای مناطق سرد و یا جلبکهای جداسازی شده در فصول سرد از فعالیت بیواکتیوی بیشتری برخوردارند.

در مطالعه حاضر EC<sub>50</sub> عصاره های اتانولی و متانولی جلبک قرمز *K.alvarezii* جداسازی شده از سواحل خلیج فارس به ترتیب ۰/۲۸ ± ۲/۱ و ۰/۴ ± ۲ میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد. همچنین در این مطالعه بیشترین EC<sub>50</sub> برای عصاره متانولی جلبک سبز *C.iyengarii* با میانگین ۱۲ ± ۱/۲۵mg/ml بدست آمد. همان طور که ملاحظه می شود در برخی از موارد عصاره هایی که انتظار می رود فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری داشته باشند کمترین فعالیت داشتند که این مورد در پژوهشهای قبلی هم ملاحظه شده است مثلاً در یک مطالعه عصاره آبی جلبکهای Noori و Kambu از عصاره الکلی آنها اثرات آنتی اکسیدانی بیشتری داشتند اما در همان مطالعه دیده شده بود که عصاره الکلی جلبکهای Wakame و Hijki اثرات آنتی اکسیدانی قویتری نسبت به عصاره آبی آنها دارد (Hong و Ismaeil، ۲۰۰۲). همچنین این نتایج با نتایج پژوهش های دیگری نیز پشتیبانی می شود (Duffy و Power، ۲۰۰۱) در گزارشی توصیف شده که نمونه های مختلف جلبکی در حلالهای مختلف اثرات آنتی اکسیدانی متفاوتی نشان می دهند.

تاکنون مشخص شده که چندین ترکیب شیمیایی در جلبکهای دریایی نقش آنتی اکسیدانی دارند که از بین آنها می توان به پلی فنلها اشاره کرد. پای فنلها توسط اکثر گیاهان از جمله جلبکهای دریایی تولید می شوند (Duan, ۱۹۸۸). ترکیبات فنلی آنتی اکسیدانهای قوی هستند، آنها از طریق چلاته شدن<sup>۱</sup> با اتمهای فلزی، از شکل گیری رادیکالهای آزاد پیشگیری کرده و باعث فعال سازی سیستم آنتی اکسیدانی داخل بدن موجودات زنده می شوند (Al-Azzawie و Mohammed-Saiel, ۲۰۰۶). عبارت ترکیبات فنلی بیش از چند صد مولکول را توصیف می کند که در ساختار خود یک حلقه بنزنی و حداقل یک گروه کربوکسیل دارند (Manach و همکاران, ۲۰۰۴). از میان پلی فنلها، اسید فنولیک، فلاونوئیدها، ایزوفلاونونها، اسید سینامیک، اسید بنزوئیک، کیورکتین<sup>۲</sup> و لیگنانها قابل توجه می باشند (Gupta و Abu-Ghannam, ۲۰۱۱؛ Keyrouz و همکاران, ۲۰۱۱). جلبکهای دریایی این ترکیبات را برای محافظت از خود در شرایط استرس و رهایی از گیاهخواران تولید می کنند (Li و همکاران, ۲۰۱۱). اکسیژن فعال (ROS) تولید شده طی متابولیسم داخلی موجودات، باعث اخلاص در عملکرد و مسمومیت داخلی می شود (Alviano و Alviano, ۲۰۰۹). عصاره های جلبکی دارای مقادیر مناسب از پلی فنلها هستند ولی این میزان قویا با روش استخراج عصاره وابسته است. گونه های *Ascophyllum spp.* از جلبکهای قهوه ای به میزان معنی داری بیشتر از سایر گونه ها ترکیبات پلی فنلی دارند و در *Ulva spp.* میزان پلی فنلها در کمترین حد است (Keyrouz و همکاران, ۲۰۱۱؛ Craige, ۲۰۱۱).

---

<sup>1</sup> Chelating

<sup>2</sup> Quercetin



## ج- رشد و بازماندگی

با توجه به نتایج  $LC_{50}$  و سمیت<sup>۱</sup> عصاره های مختلف برای ناپلی آرتمیا، در آزمونهای درون تن از عصاره اتانولی جلبکهای مختلف استفاده شد. کلا در مقوله سمی بودن یا نبودن یک عصاره برای ناپلی آرتمیا، دامنه مشخصی از  $LC_{50}$  در نظر گرفته می شود که  $LC_{50}$  در دامنه  $0-80 \mu g/ml$  به عنوان دز سمی شدید، دامنه  $80-250 \mu g/ml$  سمیت متوسط و بیشتر از  $250 \mu g/ml$  به عنوان دز سمی ضعیف اتلاق می گردد (Ramos و همکاران، ۲۰۰۹). در این مطالعه  $LC_{50}$  عصاره اتانولی جلبکهای مختلف برای ناپلی آرتمیا در ۲۴ ساعت، در گستره  $3800-580 \mu g/ml$  بدست آمد که کمترین و بیشترین آن به ترتیب متعلق به جلبک های *S.ilicifolium* و *G.corticata* بود.  $LC_{50}$  سایر عصاره ها بین این دو مقدار قرار داشت و در کل ترتیب سمیت آنها به صورت *S.ilicifolium* > *S.angustifolium* > *K.alvarezii* > *C.iyengarii* > *L.snyderiae* > *P.borgesseni* > *G.corticata* بود. در مطالعات پیشین نیز سمیت عصاره های گونه های سارگاسوم نسبت به گونه های دیگر قویتر بدست آمده بود، به طوریکه  $LC_{50}$  جلبکهای *S.marginatum*، *S.variable* و *S.aspermum* طی ۲۴ ساعت حدود  $100 \mu g/ml$  گزارش شده بود و همچنین دز  $500 \mu g/ml$  باعث شده بود همه ناپلی ها طی ۲۴ ساعت تلف شوند (Rashmi و همکاران، ۲۰۱۱). در مطالعه دیگری نیز سمی ترین جلبک از بین چندین جلبک مورد مطالعه، برای ناپلی آرتمیا جلبک *S.asperum* بود (Ara و همکاران، ۱۹۹۹). در تحقیق دیگری میزان

---

<sup>1</sup> Toxic

LC<sub>50</sub> عصاره اتانولی جلبک *G.fisheri* برای ناپلی آرتمیا برابر ۴/۳mg/ml بدست آمد که به نتیجه مطالعه ما نزدیک است (Kanjana و همکاران، ۲۰۱۱).

همچنین LC<sub>50</sub> همه عصاره ها برای ناپلی آرتمیا وابسته به دز بود به نحوی که با افزایش دز عصاره، میزان تلفات آرتمیا بیشتر می شد.

تعداد باکتریهای (*Vibrio spp.*) موجود در بافت بچه میگوهای که در محیط کشت حاوی باکتری پرورش پیدا کرده بودند به میزان قابل توجهی نسبت به گروه کنترل منفی که در محیط فاقد باکتری تلقیح شده (به صورت دستی) پرورش یافته بود، بیشتر بود ؛ اما شمارش ویبریوها<sup>۱</sup> نشان داد، میزان باکتری در بافت بچه میگوهای که از آرتمیای غنی سازی شده توسط عصاره الکلی جلبکها تغذیه شده بودند نسبت به گروه کنترل مثبت کمتر بود. این امر نشان داد که عصاره های اتانولی همه جلبکها و در همه دز ها قادر بوده اند نسبت به جیره غذایی گروه کنترل بر بیماری ویبریوزیس موثر باشند. این نتیجه با پژوهشهای پیشین نیز مطابقت دارد. قبلا دیده شده بود، پست لاروهای (PL<sub>1-25</sub>) میگوهای منودون پرورش یافته در آب حاوی باکتری، میزان بار باکتریایی در روده و سایر بافتهای آنه افزایش یافته بود در حالیکه گروههایی از بچه میگوها که عصاره متانولی برخی گیاهان دارویی از طریق غنی سازی آرتمیا دریافت کرده بودند، بار آلودگی کمتری در روده و سایر بافتهای خود نشان دادند (Citrasu، ۲۰۱۰). در یک تحقیق مشابه با این مطالعه نیز بچه میگوهای سفید هندی در محیط واجد باکتری *V.parahemolyticus* پرورش داده شده بودند، نتایج مطالعه نشان داد بچه میگوهای که از آرتمیای غنی سازی شده توسط چند گونه

---

<sup>1</sup> Vibrio count

گیاه دارویی و یا دو گونه جلبک دریایی در جیره غذایی خود استفاده کرده بودند نسبت به بچه میگوهای که از آرتمیای غنی سازی نشده استفاده کرده بودند به میزان قابل توجهی آلودگی باکتریایی کمتری در هپاتوپانکراس و سایر بافت‌های آنها دیده شده بود (Immanuel و همکاران، ۲۰۰۴).

نتایج این تحقیق نشان داد درصد بقای بچه میگوهای که در محیط فاقد باکتری تلقیح شده به محیط، پرورش یافته بودند بیشتر از گروه‌هایی بودند که در محیط حاوی باکتری پرورش پیدا کرده بودند و این نشانگر بیماری‌زا بودن دز باکتری مورد استفاده بوده است. در این مطالعه همچنین مشاهده شد که نه تنها گروه‌های تیمار میزان بار آلودگی باکتریایی کمتری نسبت به گروه کنترل مثبت داشتند بلکه از بازماندگی بیشتری نیز به نسبت گروه کنترل مثبت برخوردار بودند که این امر نشان دهنده کنترل موفقیت آمیز ویبریوزیس توسط عصاره اتانولی جلبک‌های دریایی مورد استفاده در آزمون بوده است. کنترل موفقیت آمیز پاتوژن‌های میگو مثل *V. parahemolyticus* و *V. damsela* پیش از این نیز از طریق غنی سازی آرتمیا توسط عصاره بوتانولی گیاه دارویی *W. samnifera* گزارش شده بود (Citrasu، ۲۰۱۰).

در این مطالعه پس از گروه کنترل منفی (محیط فاقد باکتری)، بیشترین درصد بقا متعلق به گروه G (۶۰۰) با  $79/4 \pm 6/6$  درصد و پس از آن گروه S (۳۰۰) و K (۶۰۰) با میزان به ترتیب  $73/3 \pm 7/3$  و  $70/6 \pm 6/6$  درصد بود که نسبت به گروه کنترل مثبت با درصد بقای  $33/3 \pm 6/6$  اختلاف معنی داری داشتند، همان طور که در نمودار ۱۲-۴ نشان داده شده سایر گروه‌های آزمون نیز درصد بقای بیشتری نسبت به گروه کنترل مثبت داشتند که معنی دار بود. این نتایج نشان از

نقش درمانی این جلبکها در ویبریوزیس در شرایط درون تن دارد . همانطور که در پژوهشی عصاره متانولی جلبک قرمز *Asparagopsis sp.* بدست آمده از سواحل هندوستان موقعی که در جیره غذایی میگوهای موندون به مدت ۴ هفته استفاده شده بود، توانسته بود از تلفات ناشی از ویبریوزیس در میگوهای گروه تیمار به نسبت گروه شاهد پیشگیری کند (Manilal و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین در یک تحقیق استفاده از عصاره جلبک قرمز *K.alvarezii* به میزان ۲۰۰ میلی گرم در لیتر در پرورش لاروی<sup>۱</sup> میگوی موندون و همراه با آلودگی مصنوعی ایجاد شده توسط ویبریوهاروی باعث شده بود تلفات تجمعی پست لاروهای گروه تیمار طی ۳۰ روز پرورش، به میزان ۲۹/۷ درصد نسبت به گروه کنترل کمتر باشد (Sivakumar و همکاران، ۲۰۱۴). در مطالعه قبلی این گروه نیز موثر بودن عصاره های جلبکهای دریایی *Ulva Skeletonema costatum* و *fasciata* و *K.alvarezii* پ کنترل ویبریوهای درخشان<sup>۲</sup> (ویبریوزیس) تایید شده بود (Sivakumar و Kannappan، ۲۰۱۳).

در پژوهش های متعددی از جلبکهای دریایی یا عصاره های آنها در مدیریت و کنترل بیماریهای باکتریایی میگوها استفاده شده است (Jose و همکاران، ۲۰۰۸؛ Lipton و همکاران، ۲۰۰۹؛ Selvin و همکاران، ۲۰۰۹).

از طرفی نتایج این تحقیق نشان داد که میزان تاثیر عصاره های جلبکی در محیط پرورش حاوی باکتری (*V.harveyi*) وابسته به دز بود به طوریکه در اکثر موارد استفاده از دزهای بالاتر جلبک موجب کاهش میزان تلفات میگوها ناشی از ویبریوزیس شده بود. در مطالعه مشابهی که از

<sup>1</sup> Larviculture

<sup>2</sup> Luminescence

عصاره متانولی جلبک سبز *Acrosiphonia orientalis* با دزهای مختلف (۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰) و ۱۶۰۰ mg/kg feed) برای کنترل تلفات و بیماری در میگوهای منودون آلوده شده توسط باکتری *V.harveyi* استفاده شده بود، دیده شد، در دزهای پایین (۴۰۰ و ۸۰۰) نسبت به دز بالاتر (۱۲۰۰ mg/kg) میزان تلفات میگوها بیشتر بود و همچنین میزان بار آلودگی باکتریایی در بافت میگوهای زنده مانده نیز نسبت به دز بالاتر، بیشتر بود. از طرفی در دز ۱۶۰۰ mg/kg شدت عفونت و آلودگی به باکتری *V.harveyi* نسبت به بقیه بیشتر بود به نحویکه ۵۲٪ میگوهای باقیمانده دارای آلودگی به باکتری بودند در حالیکه در دز ۱۲۰۰ mg/kg تنها ۳۱٪ میگوهای باقیمانده آلودگی به باکتری مذکور داشتند (Manilal و همکاران، ۲۰۱۲) و نویسندگان این دز را به عنوان موثرترین دز معرفی کردند.

جلبکهای دریایی منبع مهمی از تعداد زیادی از اسیدهای چرب غیر اشباع بلزنجیره بلند (PUFA)، کاروتنوئیدها، فیکوبیلی پروتئینها<sup>۱</sup>، پلی ساکاریدها و فیکوتوکسین<sup>۲</sup> می باشند (Chu، ۲۰۱۲). گزارش شده که این لیپیدها می توانند طیف وسیعی از میکروارگانیزم ها را از طریق تخریب غشای سلولی مهار کنند (Bergsson و همکاران، ۲۰۱۱). مشخص شده که اسیدها ی چرب اشباع و غیر اشباع می توانند از چسبیدن اولیه باکتریها به سطوح مختلف و تشکیل بیوفیلم ممانعت کنند (Davis و Marques، ۲۰۰۹). اساس کار اسیدهای چرب با زنجیره بلند (بیش از ۱۰ اتم کربن) در تخریب باکتریها، اثر بر پروتوپلاسم سلول و شکستن این ارگانل سلولی می باش د. در شرایط بد محیطی در جاهایی که تراکم جلبکهای پرسلولی بالا باشد، این جلبکها دفاع موثر

<sup>1</sup> Pycobiliproteins

<sup>2</sup> Pycotoxins

خود را با افزایش ترکیبات بیواکتیو متنوع خود شامل پلی ساکاریدها، پلی فنل ها، اسیدهای چرب و پپتیدها آغاز می کنند (Tierney و همکاران، ۲۰۱۰).

این تحقیق نشان داد پارامترهای رشد در همه گروههای تیمار که از عصاره اتانولی جلبکهای مختلف با دزهای متفاوت استفاده کرده بودند نسبت به گروه کنترل مثبت بهتر بود یعنی اینکه عملکرد رشد در گروههای تیمار بهبود پیدا کرده بود . بیشترین وزن کسب شده و همچنین بالاترین درصد نرخ رشد ویژه متعلق به گروه ی از تیمارها بود که از غلظت پایین عصاره اتانولی جلبک *G.corticata* استفاده کرده بود و پس از آن تیمار غلظت بالای همین عصاره قرار داشت و سپس گروه کنترل منفی قرار داشت که تفاوت این سه گروه با یکدیگر معنی دار نبود ولی با توجه به بالاتر بودن درصد بازماندگی (بقاء) پست لاروها در گروه غلظت بالای جلبک *گراسیلاریا*، به نظر می رسد پس از گروه کنترل منفی که در شرایط فاقد باکتری و بدون استرس رشد کرده بود، تیمار غلظت بالای عصاره جلبک *گراسیلاریا* از عملکرد بهتری نسبت به سایر تیمارها و گروه کنترل مثبت برخوردار بوده است.

مطالعات پیشین نیز تا حدودی این مطلب را روشن می کنند هرچند در بسیاری از مطالعات تنها یک جلبک یا دو جلبک را با گروه کنترل مورد مقایسه قرار داده اند (Briggs و Funge-Smith، ۱۹۹۶؛ Marinho-Soriano و همکاران، ۲۰۰۷).

در یک مطالعه مشابه این تحقیق نرخ رشد ویژه در بچه میگوهای سفید هندی تغذیه شده توسط آرتمیای غنی شده با عصاره جلبکهای دریایی *U.lactuta* و *S.weihitii* به ترتیب ۱/۹۵

درصد و ۱/۵۴ درصد بدست آمد که نسبت به گروه کنترل با نرخ رشد ۱/۱۱ درصد عملکرد بهتری داشتند (Immanuel و همکاران، ۲۰۰۴).

نتایج یک تحقیق که به منظور بررسی اثر زش غذایی جلبک قرمز *G.cervicornis* برای میگوهای جوان و انامی و عملکرد رشد میگوهای مذکور انجام شده بود، نشان داد که جایگزینی ۵۰٪ جیره توسط پودر این جلبک موجب رشد و بازماندگی مناسب این میگوها در شرایط آزمایشگاهی شده بود و محققین پی بردند، در صورتی که جیره غذایی به طور ۱۰۰ درصد توسط پودر جلبک تامین شود به میزان قابل توجهی رشد و بقای میگوها نسبت به گروه کنترل و تیمار ۵۰ درصد کاهش می یابد (Marinho-Soriano و همکاران، ۲۰۰۷).

همچنین این مطالعه نشان داد که افزایش وزن بدست آمده با استفاده از عصاره اتانولی جلبک های مختلف وابسته به دز بوده که در مورد جلبکهای مختلف نتایج متفاوت حاصل شده، مثلاً دز پایین جلبک های *G.corticata* و *K.alvarezii* نسبت به دز بالاتر میزان افزایش وزن بیشتری ایجاد کرد. در مورد جلبکهای *S.angustifolium* و *L.snyderiae* که از سه دز استفاده شده است، دز میانی نسبت به دزهای پایین و بالا موثرتر واقع شد. در مطالعات قبلی هم برخی محققین بیان کرده بودند که استفاده از عصاره جلبکهای مختلف یا پودر جلبکهای دریایی می تواند باعث بهبود رشد میگوها شود که وابسته به دز بوده است، مثلاً در یک مطالعه که از عصاره متانولی جلبک قهوه ای *S.wightii* با دزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم غذای بچه میگوی منودون استفاده شده بود، بالاترین بقا مربوط به دزهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بود (۹۶/۶٪) و دز ۲۰۰ میلی گرم و گروه کنترل به ترتیب با ۹۳/۳ درصد و ۸۳/۳ درصد بقای کمتری

نسبت به دو گروه قبلی داشتند. نتایج عملکرد رشد نیز نشان داد دز ۳۰۰ میلی گرم عملکرد بهتری داشت و ضریب تبدیل غذایی آن ۱/۲۱ بود در حالیکه در گروه ۱۰۰ میلی گرم و کنترل با ۱/۳۲ و ۱/۵۸ در رتبه های بعد قرار داشتند (Huxley و Lipton, ۲۰۱۰).

در پژوهش Penafiora و Golez (۱۹۹۶) مشاهده شد که میگوهای جوان وانامی (۲۰۰ میلی گرمی) که از جیره غذایی حاوی ۰.۵٪ پودر جلبک *K. alvarezii* استفاده کرده بودند نسبت به گروه کنترل (۰٪) و گروه ۱۰٪ پودر جلبک مذکور بیشترین وزن بدست آورده بودند. در مطالعه دیگری از پودر جلبک یک نوع سارگاسوم به میزان ۴-۲ درصد یا پودر کلپ (*Macrosystis pyrifera*) به میزان ۴٪ به عنوان همبند<sup>۱</sup> در جیره غذایی میگوها استفاده کردند (Suarez-Garcia, ۲۰۰۶)، نتیجه ای همانند گروه کنترل (۳٪ آلژینات خالص) بدست آوردند. همچنین گزارش شده (Cruz-Suarez و همکاران ۲۰۰۸)، موقعی که ۱۰٪ از پودر جلبک کلپ در آب حل کرده و روی جیره غذایی میگو می پاشند باعث افزایش رشد می شود ولی با افزایش آن به میزان ۱۵ و ۲۰ درصد موجب کاهش رشد میگو می گردد. اثرات جایگزینی جلبک *G. cervicornis* به جای آرد گندم و پودر سویا در جیره غذایی میگوی مونودون بررسی شده است (Briggs و Funge-Smith, ۱۹۹۶)، آنها دریافتند که جیره های حاوی ۱۵-۰ درصد پودر گراسیلاریا، نرخ رشد ویژه بین ۸-۷/۹ درصد برای میگوها ایجاد می کند اما موقعی که میزان پودر جلبک به ۳۰ درصد جیره افزایش یافت، نرخ رشد ویژه به ۷/۳ درصد کاهش پیدا کرد. همچنین در یک مطالعه دیگر از جلبکهای *K. alvarezii* و *G. heteroclada* به عنوان بایندر در جیره غذایی میگوهای جوان

---

<sup>۱</sup> Binder



مونودون استفاده شد (Penaflorida و Golez، ۱۹۹۶)، نتایج این تحقیق نشان داد، جیره های حاوی ۱۰٪ جلبک *G.heteroclada* در ۴ ساعت بیشترین ماندگاری در آب داشت، اما اختلاف میان جیره ها در حداقل بود. سطوح مختلف میزان جلبکها (۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۵ درصد) در میزان بقای میگوها تفاوت معنی داری ایجاد نکرد؛ و نرخ رشد ویژه میگوها از ۳/۳ درصد در جیره حاوی ۱۵٪ جلبک *G.heteroclada* تا ۵/۲۱ درصد در جیره حاوی ۵ درصد جلبک *K. alvarezii* متغیر بود.

نتایج این مطالعه نشان می دهد که عصاره همه جلبکهای مورد استفاده علاوه بر پیشگیری از ویبریوزیس، در عملکرد رشد بچه میگوها نیز موثر بوده است، یعنی اینکه این جلبکها دارای ارزش غذایی برای میگوها می باشند که در این میان جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* نسبت به بقیه جلبکها اثرات موثرتری بر رشد میگوها نشان داد. در مطالعات پیشین، ترکیبات شیمیایی جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* جداسازی شده از سواحل خلیج فارس (سواحل استان بوشهر) که در تغذیه موثر هستند مورد بررسی قرار گرفته است (Mohammadi و همکاران، ۲۰۱۳). نتایج این بررسی نشان داد که جلبک مذکور دارای حدود ۴۲٪ کربوهیدرات محلول و ۱۲٪ پروتیین و ۵٪ چربی بود که در موارد کربوهیدراتها و چربیها در بین ۸ جلبک مورد بررسی از بیشترین مقدار برخوردار بود و در مورد پروتیین نیز بین ۳ جلبک اول قرار داشت.

ترکیب شیمیایی جلبکهای مختلف و حتی یک جنس مثل *گراسیلاریا* ممکن است به دلایل تغییرات گونه و واریته، وضعیت فیزیولوژیک جلبک و شرایط مختلف محیطی متفاوت باشد؛ اما عموماً جنس *گراسیلاریا* غنی از پلی ساکاریدهای غیر نشاسته ای، ویتامین ها و مینرالها

می باشد (Mabeau و Fluerence، ۱۹۹۳؛ Wong و Cheung، ۲۰۰۰). در مورد ترکیب شیمیایی و ارزش غذایی جلبک *G.cervicornis* اعلام شده که دارای ۶۳٪ کربوهیدرات، ۲۳ درصد پروتئین و ۰/۵ درصد لیپید می باشد که گفته شده به عنوان مکمل می تواند در جیره غذایی میگوی وانامی استفاده شود ولی به طور کامل همه احتیاجات این میگو را برآورده نمی کند (Cuzon و همکاران، ۲۰۰۴). در هر صورت مطالعه حاضر نشان داد استفاده از عصاره های اتانولی تعدادی از جلبکهای موجود در خلیج فارس در قسمتی از جیره غذای مرحله پست لاروی بچه میگوهای وانامی می تواند علاوه بر پیشگیری از آلودگیهای باکتریایی رایج در هچریهای میگو باعث بهبود شرایط رشد و بازماندگی نیز خواهد شد.

#### د- مقاومت به ویبریوزیس

ویبریوزیس همچنان یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر و تلفات در صنعت پرورش میگوی جهان می باشد، بطوریکه طی چندسال اخیر به مهمترین عامل خسارت و کاهش تولید میگوی پرورشی جهان تبدیل شده است (Flegel، ۲۰۱۲؛ Tran و همکاران، ۲۰۱۳). استفاده از جلبکهای دریایی یا متابولیتهای آنها برای کنترل پاتوژنهای عفونی میگوها بخصوص ویبریوزیس توسط پژوهشگران متعددی گزارش شده است (Hou و Chen، ۲۰۰۵؛ Selvin و همکاران، ۲۰۱۱).

در این تحقیق تقریباً همه بچه میگوهای شاهی که در معرض باکتری *V.harveyi* قرار نگرفته بودند زنده ماندند، در مقابل بیش از ۹۰ درصد بچه میگوهای شاهی که بدون درمان توسط عصاره جلبکها در معرض باکتری قرار گرفتند طی یک هفته تلف شدند و کلیه بچه میگوهای که از طریق آرتمیای غنی سازی شده غلظتی از عصاره اتانولی یکی از جلبکهای دریایی دریافت کرده بودند در مواجهه با باکتری تلفات کمتری نسبت به گروه کنترل مثبت داشتند. این

نتایج توسط مطالعات زیادی پشتیبانی می شود، مثلاً در مطالعه ای اثبات شده بود که غذای حاوی جلبک *Ulva* قادر است آلودگی ویبریویی در میگوی منودون را مهار کند (Selvin و همکاران، ۲۰۱۱). یا اینکه در تحقیق دیگری مشخص شده بود اگر عصاره جلبکهای دریایی به طور موثری (از طریق غنی سازی آرتمیا) در جیره اضافه شود باعث افزایش مقاومت بچه میگوی سفید هندی در برابر ویبریوزیس شده و میزان بقا و تولید را به میزان قابل توجهی افزایش می دهد

(Immanuel و همکاران، ۲۰۰۴). میگوهای موزی<sup>۱</sup> تغذیه شده توسط جلبک *S. plantensis* در برابر آلودگی *V. harveyi* مقاومت نشان داده بودند (Lee و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین مشاهده شده بود میگوهای وانامی درمان شده توسط عصاره آب گرم جلبک *G. tenuistipitata* از طریق تزریقی در برابر ویبریو *آلجینولیتیکوس* مقاومت نشان دادند (Hou و Chen، ۲۰۰۵).

براساس کار دیگری عصاره آب داغ *Cinnamomum kanehirae* توانسته بود از میگوهای سفید هندی در برابر ویبریو *آلجینولیتیکوس* محافظت کند (Yeh و همکاران، ۲۰۰۹).

از بین عصاره اتانولی جلبکهای *S. angustifolium*، *L. snyderiae*، *K. alvarezii* و *G. corticata* کمترین تلفات متعلق به عصاره اتانولی جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* و بیشترین آن متعلق به جلبک *لورنسیا اسنیدریا* بود. همچنین نتایج این مطالعه مشخص کرد که هرچند میزان اثر عصاره جلبکها وابسته به دز بود اما همیشه دزهای بالا موثرتر نبود برای مثال دز ۴۰۰ میلی گرم عصاره اتانولی جلبک *L. snyderiae* میزان محافظت کنندگی بیشتری نسبت به دز ۶۰۰ میلی گرمی آن داشت و یا اثر محافظت کنندگی دزهای ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرمی جلبک *S. angustifolium* تقریباً بر هم منطبق بودند و اختلاف زیادی باهم نداشتند، لذا به نظر می رسد دزهای میانه این دو جلبک بتواند اثر مناسبی در کنترل ویبریوزیس در مرحله پست لاروی میگوی وانامی ایفا کند. این مورد نیز در پژوهشهای پیشین دیده شده است، بازماندگی بچه میگوهای منودون تغذیه شده با جیره های غذایی حاوی مقادیر مختلف عصاره جلبک قرمز (*Asparagopsis* ۲۸۵، ۵۷۵، ۸۵۰ و ۱۱۵۰) که در مواجهه با ۴ نوع باکتری خانواده ویبریو قرار گرفتند مورد بررسی قرار

---

<sup>1</sup> *Fenneropenaeus merguensis*

گرفت، در این مطالعه مشاهده شد دز ۸۵۰ mg/kg جلبک بهترین اثر درمانی در ویبریوزیس ایجاد شده دارد. اثر کنترل دز ۲۸۵ با گروه شاهد معنی دار نبود، دز ۵۷۵ هرچند باعث افزایش بازماندگی شده بود اما میگوهای باقیمانده دارای آلودگی به ویبریو بودند، دزهای ۸۵۰ و ۱۱۵۰ با اختلاف معنی داری نسبت به سایر گروهها باعث افزایش بازماندگی بچه میگوها در ویبریوزیس شدند اما میزان آلودگی بچه میگوهای باقیمانده نسبت به ویبریوها در دز ۱۱۵۰ حدود ۵۵٪ بود در حالیکه در دز ۸۵۰ این آلودگی تنها ۳۷٪ گزارش شده است (Manilal و همکاران، ۲۰۱۲).

در مورد عصاره های اتانولی دو جلبک *G.corticata* و *K.alvarezii* به نظر می رسد دزهای بالاتر مناسب تر باشند هر چند تفاوت بین دز پایین و بالای جلبک گراسیلاریا معنی دار نیست.

### نتیجه گیری کلی

این تحقیق بیان می دارد که نه تنها عصاره اتانولی ۴ جلبک دریایی انتخاب شده به منظور پیشگیری ویبریوزیس در مراکز تکثیر میگو مفید است، بلکه مناسب بودن آن در رشد و بازماندگی بچه میگوها هم مناسب است. علاوه بر آن عصاره اتانولی ۴ جلبک مورد آزمون برای درمان بیماری ویبریوزیس در مراکز تکثیر میگو نیز قابل استفاده است.



## فهرست منابع

- جلالی، محمد؛ عابدی، داریوش؛ اصغری، غلامرضا و رضایی، زینب (۱۳۸۶). بررسی اثر  
ضدمیکروبی چند نوع عصاره مختلف میوه گیاه *Pycnocycla spinosa*. مجله دانشگاه علوم  
پزشکی مازندران، ۱۷(۵۹): ۷۶-۸۶.

حیدری، محسن؛ ذوالقرنین، حسین؛ سخایی، نسرین؛ میرزایی، علی و موحدی نیا،

عبدالعلی (۱۳۹۲). ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسیدانی عصاره هیدروالکلی برخی

جلبکهای سواحل خلیج فارس در استان بوشهر. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۱(۱): ۶۲-۴۹

ریاحی، حسین (۱۳۷۷). جلبک شناسی. جلد اول، انتشارات دانشگاه الزهراء، تهران،

صفحات ۱۱-۲۸.

سهرابی پور، جلو و سرطاوی، کهزاد (۱۳۸۰). گزارش نهایی طرح فلور جلبکی استان

بوشهر. مرکز تحقیقات منابع طبیعی استان بوشهر. ۱۰۸ صفحه.

عیوقی، فرنوش؛ برزگر، محسن؛ سحری، محمدعلی و نقدی بادی، حسنعلی (۱۳۸۸).

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس شوید در روغن سویا و مقایسه آن با آنتی اکسیدانهای

شیمیایی، فصلنامه گیاهان دارویی. ۲(۳۰): ۸۳-۷۱.

دشتیان نسب، عقیل؛ افشارنسب، محمد؛ قائدینا، طبک؛ میربخش، مریم؛ یگانه و حید؛

کشتکار عیسی؛ فارسی، امید و شریفی، حسن. ۱۳۸۵. مطالعه اثر ارگوسان و ویرومکس بر رشد و

بازماندگی پست لاروهای میگوی وانامی و نقش آن در پیشگیری از بیماریهای ویروزی و لکه

سفید میگو. موسسه تحقیقات شیلات ایران. صفحات ۴۵-۱۸.

کیان مهر، هرمزدیار . ( ۱۳۸۴). بیولوژی جلبکها . انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد،

صفحات، ۱۲-۲۵.

قونجیک، بایرام محمد (۱۳۷۹). شناسایی جلبکهای دریایی سواحل استان سیستان و

بلوچستان. مجله علمی شیلات ایران، ۹(۱): ۳۷-۴۸.

قونجیک، بایرام محمد (۱۳۸۲). شناسایی و تعیین پراکنش گیاهان دریایی مناطق زیر جزر

و مدی در سواحل استان سیستان و بلوچستان. مجله علمی شیلات ایران، ۱۲(۳): ۱۴۰-۱۲۷.

قونجیک، بایرام محمد و روحانی قادیکلایی، کیومرث (۱۳۸۹). اطلس جلبکهای دریایی

سواحل خلیج فارس و دریای عمان. انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۷۰ صفحه.

قونجیک، بایرام محمد؛ واین، مایکل؛ بنگ می، خیا؛ خواجه، سلیمه؛ کیانمهر، هرمزدیار و

حسینی، محمدرضا (۱۳۹۰). مطالعه توده زنده جلبکهای قرمز دریایی دارویی در محدوده بین جزر

و مدی ساحل چابهار. مجله علمی شیلات ایران، ۲۰(۳): ۱۱۴-۱۰۳.

مصحفی، محمدحسن؛ منصوری، شهلا؛ شریفی فر، فریبا و خوشنودی، محمد (۱۳۸۵).

اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره گیاه آویشن شیرازی در شرایط برون تن .

مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۴(۱): ۴۳-۳۳.

مقیم، اعظم؛ افشارنسب، محمد؛ دشتیان نسب، عقیل؛ مصباح، مهرزاد و یگانه، وحید

(۱۳۹۲). بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های بیماریزای جداسازی شده از مراکز تکثیر میگو

در استان بوشهر. دو ماهنامه طب جنوب، ۱۶(۶): ۴۷۸-۴۶۷.

نبی پور، ایرج و مراد حاصلی، (۱۳۸۰). جلبکهای دارویی خلیج فارس . انتشارات علوم

پزشکی و خدمات درمانی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر. صفحات ۴۵-۲۳.





Abraham, T.J. and Palaniappan R. (2004). Distribution of luminous bacteria in semi intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. *Aquaculture*, 232: 81-90.

Akhtar, P. and Sultana, V. (2002). Biochemical Studies of Some Seaweed Species From Karachi coast. *Records Zoological Survey of Pakistan*, 14, 1-4.

Al-Azzawie, H.F. and Mohamed-Saiel, S.A. (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Science*, 78: 1371-1377.

Alviano, D.S. and Alviano, C.S. (2009). Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Current Pharmacology and Biotechnology*, 10: 106-121.

Andriamanantoanina, H. and Rinaudo, M. (2010). Characterization of the alginates from five madagascan brown alga. *Carbohydrate Polymers*, 82: 555-560.

Anggadiredjal, J.; Andyani, R. and Hayati, M. (1997). Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* Phaeophyta and *Laurencia obtuse* Rhodophyta from Seribu Islands. *Journal of Applied Phycology*, 9: 477–479.

Ara, J.; Sultana, V.; Ehteshamul-Haque, S.; Qasim, R. and Ahmad, V.U. (1999). Cytotoxic activity of marine macro-algae on *Artemia salina* (brine shrimp). *Phytotherapy Research*, 13(4): 304–307.

Bandara, B.M.R.; Gunatilaka, N.K.; Kumar, N.S.; Wimulasiri, W.R.; Adikaram, N.K.B. and Balasubramaniam, S. (1988). Antibacterial activity of some marine algae of Srilanka. *J. Nat. Sci. Council Srilanka*, 16:209-221.

Bansemir, A.; Blume, M.; Schröder, S. and Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252: 79–84.

Bansemir, A.; Blume, M.; Schroder, S. and Lindequist, U., 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*. 252: 79–84

Bartle, S. (2005). The columbia Encyclopedia, VI Edition, Columbia University Press.

Bartolomeu, W. S.; Miguel, A. C.; Joana, T. M.; Mafalda, A. C. Q.; Antonio C. S. F.; Jose A. T. and Antonio A.V. (2011). Antioxidant Potential of Two Red Seaweeds from the Brazilian Coasts. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 59(10): 5589–5594.

Baticados, M.C.L. and Padihare, J.O. (1992). The use of chemotherapeutic agent in the Philippines. In: Shariff, I.M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), *Disease in Asian Aquaculture. Fish Section*. Asian Fishery Society, Manila, Philippines, pp. 531– 546.

Baticados, M.C.L.; Lavilla-Pitigo, C.R.; Cruz-Lacicerda, E.R.; Delapena, L.D. and Sunaz, N. A. (1990). Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Disease of Aquatic Organisms*, 9:133-139.

Bell, G.J.; Henderson, R.J.; Tocker, D.R.; Ghee, F.M.; Dick, J.R.; Porter, A.; Smullen, R.P.; Legendre, M.; Kerdchuen, N.; Corraze, G. and Bergot P. (1995). Larval rearing of African catfish, *Heterobranchus longifilis* (Teleostei, Clariidae): Effect of dietary lipids on growth, survival and fatty acid composition of fry. *Aquatic Living Resources*, 8:355–363.

Bergsson, G.; Hilmarsson, H. and Thormar, H. (2011). Antibacterial, antiviral and antifungal activities of lipids. In: Thormar H. (eds), *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. John Wiley & Sons Limited, Chichester, United Kingdom. pp. 47-80.

Borgesen F., 1939. Marine algae from the Iranian Gulf specially from the nearest part near Bushehr and Khark, Part: 1., pp.47-141.

Briggs M.R.P. and Funge – Smith, S. J. (1996). The potential use of *Gracilaria* sp. meal diets for juvenile *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture Research*, 27:345-354.

Caldwell G.S.; Bentley M.G. and Olive P.J.W. (2003). The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. *Toxicon*, 42(3):301-6.

Capone, G. D.; Weston, P. D.; Miller, V. and Shoemaker, C. (1996). Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture*, (145): 55-75.

Chan, J. C. C.; Cheung, P. C. and Ang, J. P.O. (1997). Comparative studies on the effect of three drying methods on the nutritional composition of seaweed *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. Ag. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3056–3059.

Chiheb, I.; Riadi, H.; Martinez-Lopez, J.; Dominguez, S.J.F.; Gomez, V.J.A.; Bouziane H. and Kadiri, M. (2009). Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *African Journal of Biotechnology*, 8: 1258-1262.

Chotigeat, W., Tongsupa, Supamattaya, S. and Phongdara, A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, 23-30.

Chotigeat, W.; Tongsupa, S.; Supamataya, K. and Phongdara, A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, 233:23–30.

Chouhury, S.; Sree, A.; Mukherjee, S. C.; Pattnik, P. and Bapuji M. (2005). *In Vitro* Antibacterial Activity of Extracts of Selected Marine Algae and Mangroves against Fish Pathogens. *Asian Fisheries Science*, 18: 285-294.

Chu, W.L. (2012). Biotechnological applications of microalgae. *International e-Journal of Science, Medicine & Education* 6(1):24-S37.

Citarasu, T.; Sekar, R.R.; Babu, M.M. and Marian, M.P. (2002). Developing *Artemia* enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*. *Asian Fisheries Science*, 15:21–32.

Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18:403–414.

Collins, S. (2001). UWC –Enviro facts  
<http://www.botany.uwc.ac.za/Envfacts/seaweeds>

Cox, S.; Abu-Ghannam, N. and Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal*, 17(1): 205-220.

Craige, J.S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, 23: 371-393.

Cruz-Suarez, Tapia Salazar, M.; Nieto Lopez, M. and Rique, D. (2008). A Review of Effects of Macroalgae in Shrimp Feeds and Co-Culture. *Programa of Maricultura*, University of Mexico. 304-333pp.

Cunningham, S. and Joshi, L. (2010). In: *Transgenic Crop Plants*; Kole, C. Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, pp. 343-35.

Cuzon, G.; Lawrence, A.; Gaxiola, G.; Rosas, C. and Guillame J. (2004). Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, 235: 513 - 551.

Rizvi, MA.; Valeem, E.E. and Shameel M. (2011). Bioactivity, elementology and fatty acid composition of *Jolyna laminarioides* Guimaraes from a rocky ledge of Karachi, Pakistan. *International Journal of Phycology and Phycochemistry*, 7(2): 153-162.

Dashtiannasab A.; Kakoolaki S.; Sharif rohani M. and Yeganeh V. 2012. *In vitro* effects of *Sargassum latifolium* (Agardeh, 1948) against selected bacterial pathogens of shrimp. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 11(4) 765-775.

Daun, H. (1988). The chemistry of carotenoids and their importance in food. *Journal of Clinical Nutrition*, 7: 97- 100.

Smith, A. (1992). Farming edible seaweeds in the Caribbean. *Appl Phycol Forum.*, 9: 1-2.

Webb Ginger, (1997). Medicine from the sea- medicinal qualities of seaplants. *The Herbalist*”. *Vegetarian times.*, April. <http://www.findarticles.com>.

Young-Joo, L.; Adlercreutz, H. and Kwon, H.J. (2006). Quantitative Analysis of Isoflavones and Lignans in Sea Vegetables Consumed in Korea Using Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Science and Biotechnology.*, 15, 1;102-106.

Watanabe, F.; Takenaka, S.; Katsura, H.; Masumder, S.A.; Abe, K.; Tamura, Y. and Nakano, Y. ( 1999). Dried green and purple lavers (Nori) contain substantial amounts of biologically active vitamin B(12) but less of dietary iodine relative to other edible seaweeds. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 47(6):2341-3

Stolker, A. A.M. and Brinkman, U.A. Th. (2005). Analytical strategies for residues analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review. *Journal of Chromatography*, 1067: 15-53.

Bilan, M.I.; vinogradova, E.V.; Shashkov, A.S. and Usov, A.I. (2007). Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the pacific green alga *Codium yezoense*. *Carbohydrate Research*, 342:586-596.

Chew, Y.L.; Lim, Y.Y.; Omar, M. and Khoo, K.S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia LWT. Food Science and Technology., 41(6): 1067-1072.

Dawes, R. M. (1980). "Social dilemmas". *Annual Review of Psychology* **31**: 169–193. [doi:10.1146/annurev.ps.31.020180.001125](https://doi.org/10.1146/annurev.ps.31.020180.001125)

Kaladharan, P.; Navas, K. A. and Kandan. S. (1998). Seagrass production in Minicoy atoll of Lakshadweep Archipelago. Indian Journal of Fisheries, 45 (1): 79-83.

Ballesteros, E.; Martin, D. and Uriz, M. J. (1992). Biological activity in Mediterranean macrophytes. Botanica Marina, 35: 481 -485.

Davies DG, Marques CNH (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. Journal of Bacteriology, 191:1393-1403.

Davies, A. (2002). Basic introduction to seaweeds, <http://www.freakinfucus.co.uk/index.htm>. 37.

Devienne, K.F. and Raddi, M.S.G. ( 2002). Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. Brazilian Journal of Microbiology, 33: 166-168.

Duffy, C. F. and Power, R.F. (2001). Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. International Journal of Antimicrobial Agents, 17: 527-529.

FAO, 2003. A guide to the seaweed industry. Fao fisheries technical papers No. 441. ISSN 0429-9345. FAO. Rome.

Flegel, T.W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. Journal of Invertebrate Pathology, 110:166-173.

Garcia-Armisen, T.; Vercammen, K.; Passerat, J.; Triest, D.; Servais, P. and Cornelis, P. (2011). Antimicrobial resistance of heterotrophic bacteria in sewage-contaminated rivers. Water Research, (45): 788-796.

Ghaednia, B.; Mehrabi, M. R.; Mirbakhsh, M.; Yeganeh, V.; Hoseinkhezri, P.; Garibi, G. and Ghaffar, J. A. (2011). Effect of hot water extract of brown seaweed *Sargassum glaucescens* via immersion route on immune responses of *Fennerpenaeus indicus*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(4), 616-630.

Gupta, S. and Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trend in Food Science & Technology*, 22: 315-326.

Gupta, S. and Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovate Food Science and Emergence Technology*, 12: 600-609.

Harbo, R.M. (1999). *Whelks to Whales Coastal Marine Life of the Pacific Northwest*. Harbour Publishing, Madeira Park, B.C., Canada

Hashim, R. and Mat Saat N. A., 1992 The utilization of seaweed meals as binding agents in

Hektoen, H., Berge, J.A., Hormazabal, V., Yndeslad, M., (1995). Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture*, 133:175–84.

Hellio, C.; De La Broise, D.; Dufosse, L.; Le Gal, Y. and Bourgougnon, N. (2001). Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine Environmental Research* 52 (3): 231–247.

Herwing, R.P.; Gary, J.P. and Weston, D.P. (1997). Antibiotic resistant bacteria in surficial sediments near Salmon net cage farms in Puget Sound, Washington. *Aquaculture* ,14: 263–283.

Holdt, S.L. and Kraan ,S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23: 543-597.



Hornsey, I.S., Hide, D., (1985). The production of antimicrobial compounds by British Marine Algae. IV Variation of antimicrobial activity with algal generation. British Phycology Journal, 20: 21-25.

Hornsey, I. and Hide, D. (1974). The production of antimicrobial compounds by British marine algae 1. Antibiotic-Producing marine algae. Br. Phycol. J., 9: 353-369.

Hou, W.Y. and Chen, J.C. (2005). The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunol. 19 (2): 127–138.

Huang, X.; Zhou, H, 2006. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extract on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Fish & Shellfish Immunology. 20: 750-7.

Hudinaga, M. (1942). Reproduction, development and rearing of *P. japonicus*. Japonia Journal of Zoology, 10(2): 305-393.

Huxley, V.A.J. and Lipton, A.P. (2010). Immunomodulatory effect of *Sargassum wightii* on *Penaeus monodon* (Fab.). The Asian Journal of Animal Science, 4 (2): 192-196

Immanuel, G.; Citarasu, T.; Sivaram, V.; Michael Babu, M. and Palavesam, A. (2007). Delivery of HUFA, probiotics and biomedicine through bioencapsulated *Artemia* as a means to enhance the growth and survival and reduce the pathogenesis in shrimp *Penaeus monodon* postlarvae. Aquacult International, 15: 137–152.

Immanuel, G.; Palavesam, A. and Marian, M. (2001). Effects of feeding lipid enriched *Artemia* nauplii on survival, growth, fatty acids and stress resistance of post larvae *Penaeus indicus*. Journal of Asian Fisheries Science 4,

Immanuel, G.; Vincybai, V.C.; Sivaram, V.; Palavesam, A. and Marian, M.P. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. Aquaculture, 236: 53–65.

Immanuel, G.; Vincybai, V.C.; Sivaram, V.; Palavesam, A. and Marian, M.P. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, 236: 53–65.

Indu, H. and Seenivasan, R. (2013). *In vitro* Antioxidant activity of selected seaweed from southeast coast of India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2):474-484.

Ismail, A. and Hong, T.S. (2002). Antioxidant activity of selected commercial seaweeds. *Malasian Journal of Nutral*, 8: 167–177.

Jayaprakas, V. and Sambhu, C. (1996). Growth response of white prawn, *Penaeus indicus* to dietary L-carnitine. *Asian Fish Science*, 9:209–219.

Jose, J.J., Lipton, A.P. and Subhash, S.K., 2008. Impact of marine secondary metabolites (MSM) from *Hypnea musciformis* as an immunostimulant on hemogram count and *Vibrio alginolyticus* infection in the prawn, *Penaeus monodon*, at different salinities. *Israel Journal of Aquaculture Biomidicine*, 60 (1): 65–69.

Kahl, R. and Kappus, H. (1993). Toxicity of synthetic antioxidant BHT and BHA in comparison with natural antioxidant vitamin E. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 196: 329-338.

Kandhasamy, M. and K.D. Arunachalam, (2008). Evaluation of *in vitro* antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. *African Journal of Biotechnology*, 7: 1958-1961.

Kanjana, K.; Radtanatip, T.; Asuvapongpatana, S.; Withyachumnarnkul, B. and Wongprasert, K. (2011). Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 30(1): 389–396.

Karunasagar, I.; Pai, R. and Malathi, G.R. (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203-209.

Keyrouz, R.; Abasq, M.L. and Le Bourvellec, C. (2011). Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. *Food Chemistry*, 126: 831-836.

Khan, W.; Rayirath, U.P.; Subramanian, S. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28: 386-399.

Kuda, T.; Tsunekawa, M.; Hishi, T. and Araki, Y. (2005). Antioxidant properties of dried kayamo-nori, a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *Food Chemistry*, 89: 617-622.

Kumar, K. S.; Ganesan, K. and Subba Rao, P. V. (2007). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty—an edible seaweed. *Food Chemistry*, 107: 289– 295.

Kumar, K. S.; Ganesan, K. and Subba Rao, P.V. (2008). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. *Food Chemistry*, 107: 289–295.

Lavilla-Pitogo, CR. (1995). Bacterial diseases of penaeid shrimps: an Asian view. In: Shariff M, Arthur JR, Subasinghe RP (eds) *Diseases in Asian Aquaculture II*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, p 107-121.

Lee, Y.K.; Chew, P.F.; Soh, B.S. and Tham, L.Y. (2003). Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus mergueneis* by feeding *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 15:279–287.

Lepage G. and Roy C.C., (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*, 25:1391-1396.

Li, Y.X.; Wijesekara, I.; Li, Y. and Kima, S.K. (2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*, 46: 2219-2224.

Lightner, D.V. 2003. Exclusion of specific pathogens for disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program. pp. 81-116, *in*: Lee, C.-S, and O'Bryen,

P.J. (eds.) Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

Lipton, A.P., Pramitha, V.S., Jose, J.J., 2009. Marine secondary metabolites (MSM) from macro algae enhance bacterial clearance in hemolymph of *Penaeus monodon*. *Isr. J. Aquacult-Bamid*. 61 (1),42–47.

Ma, D.; Hu, Y.; Wang, J.; Ye, S. and Li, A. (2006). Effects of antibacterials use in aquaculture on biogeochemical processes in marine sediment. *The Science of the Total Environment*, (367) 1: 273-277.

Mabeau, S. and Fleurence, J. (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Science and Technology*, 4,103–7.

MacKinnon, S.A.; Craft, C.A.; Hiltz, D.; Ugarte, R. (2010). Improved methods of analysis for betaines in *Ascophyllum nodosum* and its commercial seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology*, 22: 489-494.

Mahasneh, I.; Jamal, M.; Kashashneh, M. and Zibdeh, M. (1995). Antibiotic activity of marine algae against multiantibiotic resistant bacteria. *Microbios*, 83, 23–26.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remes, C. and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-747.

Manilal, A., Selvin, J., Sujith, S., Panikkar, M.V.N., 2012. Evaluation of therapeutic efficacy of Indian green alga, *Acrosiphonia orientalis* (J. Agardh) in the treatment of vibriosis in *Penaeus monodon*. *Thalassas International Journal of Marine Science*, 28 (1): 33–46.

Aguirre-Guzmán, G.; Ascencio, F. and Saulnier, D. (2005). Pathogenicity of *Vibrio penaeicida* for white shrimp *Litopenaeus vannamei*: a cysteine protease-like exotoxin as a virulence factor. *Disease of Aquatic Organisms*. 67: 201–207.

Manilal, A.; Selvin, . and George, S. (2012). *In vivo* therapeutic potentiality of red seaweed, *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) in the treatment of Vibriosis in *Penaeus monodon* Fabricius. Saudi Journal of Biological Sciences, 19:165–175.

Marinho-Soriano, E.; Camara M.R.; Cabral T.M. and Carneiro, M.A.A. (2007) . Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial substitute for the industrial feeds used in shrimp ( *Litopenaeus vannamei*) farming. Aquaculture Research, 38:182 – 187.

Matelijan, G. (2006). The world's healthiest foods. <http://www.whfoods.org>

Matsukawa, R.; Dubinsky, Z.; Kishimoto, E.; Masaki, K.; Masuda, Y.; Takeuchi, T.; Yamamoto, Y.; Niki, E. and Karube, I. (1997). A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. Journal of Applied Phycology, 9: 29–35.

Matyar, F.; Kaya, A. and Dinçer, S. (2008). Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. Science of the Total Environment, (407): 279-285.

Mayalen, Z.; Daniel, R. and Yolanda, F.P. (2007). Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. Journal of Applied Phycology, 19: 449–458.

Mohammadi M.; Tajik H. and Hajeb P. (2013). Nutritional composition of seaweeds from the Northern Persian Gulf. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12(1): 232- 240.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal Science Technology,;26 (2):211-219.

Mtolera, M.S.P. and Semesi, A.K. (1996). Antimicrobial activity of extracts from six green algae from Tanzania. Current Trends Marine Botanical Research of African Region, P:211-217.

Multidrug Resistant Human Pathogen *Acinetobacter baumannii* and Fish Pathogens. World Journal of Fish and Marine Sciences, 3(1): 51-57.

NACA, 2012. Asia Pacific Emergency Regional Consultation on the Emerging Shrimp Disease: Early Mortality Syndrome (EMS) /Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS). NACA, Bangkok, Thailand.

Nash, G.; Nithimathahoke, C.; Tungmandi, C.; Arkarjamon, A. and Rumathaversub, P. (1992). Vibriosis and its control in pond reared *P. monodon* in Thailand. In: Shariff, M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila p: 71-80.

Paez-Osuna, F.; Gracia, A.; Flores-Verdugo, F.; Lyle-Fritch, L. P.; Alonso-Rodriguez, R.; Roque, A. and Ruiz-Fernandez, A. C. (2003). Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. Marine Pollution Bulletin, (46) 7: 806-815.

Paula, E.J.; Pereira, R.T.L. and Ohno, M. (2002). Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of Sao Paulo State, Brazil. Phycol Research, 50:1-9.

pelleted feeds for snakehead (*Channa striatus*) fry and their effects on growth. Aquaculture 108:299-308

Penaflorida V. D. and Golez N. V. (1996). Use of seaweed meals from *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture, 143:393-401.

Pesando, D. and B. Caram, 1984. Screening of marine algae from the French Mediterranean Coast for antibacterial and antifungal activity. Botanica Marina, 27: 381-86.

Plaza, M.; Santoyo, S. and Jaime, L. (2010). Screening for bioactive compounds from alga. Journal of Pharmaceutical and Biomedicine Analysis, 51:450-455.

Primavera, J.H.; Lavilla-Pitogo, C.R.; Ladja, J.M. and Dela Pena, M.R., (1993). A survey of chemicals and biological products used in intensive shrimp farms in the Philippines. *Marine Pollution Bulletin*, 26: 35–40.

Pulz, O. and Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*, 65: 635-648.

Pushparaj, A.; Raubbin R.S. and Balasankar T. (2014). Antibacterial activity of *Kappaphycus alvarezii* and *Ulva lactuca* extracts against human pathogenic bacteria. *International Journal Current Microbiology Applied Science*, 3(1): 432-436.

Rahim, Z.; Sanyal, S.C.; Aziz, K.M.S.; Huz, M.I. and Chowdhury, A.A., (1998). Isolation of enterotoxigenic, haemolytic and antibiotic resistant *Aeromonas hydrophila* strains from infected fish in Bangladesh. *Applied Environmental Microbiology*, 48: 865– 867.

Rajauria, G.; Jaiswal, A.K.; Abu-Ghannam, N. and Gupta, S. (2012). Antimicrobial, Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacity of Brown Seaweed *Himanthalia Elongata* from Western Coast of Ireland. *Journal of Food Biochemistry*. (DOI:10.1111/j.1745-4514.2012.00663.x)

Ramos S.C.S.; Oliveira J.C.S.; Camara C.A.G.; Castelar, I.; Carvalho, A.F.F.U. and Lima-Filho J.V. (2009). Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. *Rev. Bras. Farmacogn*;19:376-81.

Rao, P.S. and Parekh, K.S. (1981). Antibacterial activity of Indian Seaweed Extracts. *Botanica Marina*, 24: 577-589.

Rao, P.S.; Girijavallaban, K.G.; Muthasarny,S.; Chandrica, V.; Gopinathan,C.P.;Kalimuthu,S. and Najmoddin, M. (1991). Bioactivity in marine algae. In:Bioactive compounds from marine organisms with emphasis on the India ocean: An Indo-United State symposium. Oxford and IBH pub. Co., New Delhi, ISBN-10:(8120405749), p 373-377.

Rashmi, C.; Vinayak, A.; Sabu, S. and Chatterji, A. (2011). Bio-Prospecting of a Few Brown Seaweeds for Their Cytotoxic and Antioxidant Activities. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 24:1-9.

Rastian, Z.; Mehranian, M.; Vahabzadeh, F. and Sartavi K. (2007). Antioxidant activity of extract from a brown alga, *Sargassum boveanum*. African Journal of Biotechnology 6 (24): 2740-2745.

Reichelt, J.L. and Borowitzka, M.A. (1984). Antimicrobial activity from marine algae: Results of a large scale screening programme. Hydrobiology, 116/117: 158-168.

Rengpipat, S.; Tunyanun, A.; Fast, A.W.; Piyatiratitivorakul S. and Menasveta, P. (2003). Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pondreared Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*, fed a *Bacillus* probiotic. Disease Aquatic Organisms, 55:169-173.

Ruangpan, L.; Tabkaew, R.; Yoshida, T.; Kawatsu, H. and Saitanu, K. (1995). Numerical taxonomy of *Vibrio* spp. isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Thailand. In : Shariff, M. Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (eds) Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila p 131-140.

Ruangsri, J.; Wannades, M.; Wanlem, S.; Songnui, A.; Arunrat, S.; Tanmark, N.; Pecharat, J. and Supamattaya, K. (2004). Pathogenesis and virulence of *Vibrio harveyi* from southern part of Thailand in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. Songklanakarin Journal Science Technology, 26 (1): 43-54.

Sachindra, N.M.; Sato, E.; Maeda, H.; Hosokawa, M.; Niwano, Y.; Kohno, M. and Miyashita, K. (2007). Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. Journal of Agriculture Food Chemistry, 55: 8516–8522.

Salvador, N.; Gomez-Garreta, A.; Lavelli, L. and Ribera, L. (2007). Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. Science of Marine, 71: 101-113.

Samuelson, O.B. (1992). The fate of antibiotics/chemotherapeutants in marine aquaculture sediments. In: Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to



Reality. Michel, C. and Alderman, D.J. (Ed), pp. 87-95, Office International des Epizooties, Paris, France.

Sanchez Campos, L.N.; Herrera, F.D.; Araujo, A.D.R.; Sanchez, R.A.G.; Partida, M.L.L.; Ruiz, M.D.A. and Navarro, A.F.L. (2014). *Litopenaeus vannamei* immunestimulated with *Macrocystis pyrifera* extract: improving the immune response against *Vibrio campbellii*. Journal of Coastal Life Medicine, 2(8): 617-624.

Sastry, V.M.S. and Rao, G.R.K. (1994). Antibacterial substances from marine algae: Successive extraction using benzene, chloroform and methanol. Botanica Marine, 37: 357-360.

Selvin, J.; Huxley, A.J. and Lipton, A.P. (2004). Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. Aquaculture 230, 241–248.

Selvin, J.; Ninawe, A.S. and Lipton, A.P. (2009). Shrimp Disease Management: Prospective Approaches. ANE Publishers, New Delhi, India.

Selvin, J.; Manilal, A.; Sujith, S.; Kiran, G.S. and Lipton, A.P. (2011). Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases. Latin American Journal of Aquaculture Research, 39 (2):197–204.

Shangliang, T. (1990). The antibacterial and antiviral activity of herbal extracts for fish pathogens. Journal of Ocean University of Qingdao 2:53–60.

Sivakumar, K. and Kannappan, S. (2013). Inhibitory effect of marine algae collected from the East and West coast of India against luciferase and luminescence producing *Vibrio harveyi*. African Journal of Biotechnology, 12(22):3493- 3502.

Sivakumar, K.; Kannappan, S.; Dineshkumar, M. and Patil, P.K. (2014). Antagonism of marine macro alga *Kappaphycus alvarezii* extract against luminescence disease causing *Vibrio harveyi* during *Penaeus monodon* larviculture. African Journal of Microbiology Research, 8(6):458-469

Song, Y.L. and Sung, H.H. (1993). Vibriosis resistance in tiger shrimp (*P. monodon*) induced by M. glucon treatment. From discovery to commercialization. European Aquaculture Society, 9, 97 Oostende, Belgium, pp:86-97.

seaweed *Gracilariopsis longissima* (Rhodophyta, Gracilariaceae): A potential resource for biotechnological purposes? New Bio-technology Journal, 29 (3), 443-450.

Stirk, W.A.; Van Staden, J. (1997). Isolation and identification of cyto-kinins in a new commercial seaweed product made from *Fucus ser-ratus* L. Journal of Applied Phycology, 9: 327-330.

Stolker, A. A. M. and Brinkman, U.A. Th. (2005). Analytical strategies for residues analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review. Journal of Chromatography A, (1067):15-53.

Suarez-Garcia, H.A. (2006). Effect of alginate and two seaweeds *sargassum* sp. and *Macrocystis pyrifera* as binder in shrimp *Litopenaeus vannamei* pellet mill. Aquaculture Nutrition, 8(4): 418-426.

Sung, H.H. and Song, Y.L. (1996). Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture, 45(1): 41-54.

Taskin, E.; Ozturk M. and Kurt, O. (2001). Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). African Journal of Biotechnology, 6: 2746-2751.

Tierney, J. E.; Russell, J. M.; Eggermont, H.E.; Hopmans, C.; Verschuren, D. and Damate, J. S. (2010). Environmental controls on branched tetraether lipid distributions in tropical East African lake sediments. *Geochimica et Cos-mochimica Acta*, 74:4902–4918.

Tran, L.; Nunan, L.; Redman, R M.; Mohny, L L.; Pantoja, C R.; Fitzsimmons, K. and Lightner, D V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105: 45–55.

Tsoumas, J.V.; Alderman, D.J. and Rodgers, C.J. (1989). *Aeromonas salmonicida*, development of resistance to 4- quinolone antimicrobials. *Journal of Fish Diseases*, 12: 493–507.

Tuney, I.; Cadirci, B.H. Unal D. and Sukatar, A. (2006). Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the Coast of Urla (Izmir, Turkey). *Turkish Journal of Biology*, 30: 1-5.

Turner, N.J. (2003). The ethnobotany of edible seaweed porphyra and its use by the first nations of Pacific Cannada. *Cannada Journal of Botany.*, 81:283-293.

Velmurgan, S. and Citrasu, T. (2010). Effect of Herbal Antibacterial Extracts on the Gut Floral Changes in Indian White Shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(6):5709-5717.

Vlachos, V.; Critchley A.T. and Holy A. V. (1997). Antimicrobial activity of extracts from selected Southern African marine macroalgae. *Southern African Journal of Science*, 93: 328-32.

Wong H.K. and Cheung, K.C.P. (2000). Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds Part I. Proximate composition, amino acid profiles and some physico - chemical properties. *Food Chemistry*, 71: 475 - 482.

Yeh, R.Y.; Shiu, Y.L.; Shei, S.C.; Cheng, S.C.; Huang, S.Y.; Lin, J.C. and Liu, C.H. (2009). Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 27:26–32.

Yeh, S. T.; Lee, C. S. and Chen, J. C. (2006). Administration of Hot Water Extract of Brown Seaweed *Sargassum duplicatum* via Immersion and Injection Enhances The Immune Resistance of White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 332-345.

Youngsblood, W.W.; Blumer, M.; Guillard R.R.L. and Flore, F. (1971). Saturated and unsaturated hydrocarbons in marine benthic algae. *Marine Biology*, 8: 190-201.

Yuan, Y. V.; Carrington, M. F. and Walsh, N. A. (2005). Extracts from dulce (*Palmaria palmata*) are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation in vitro. Food and Chemical Toxicology, 43(7): 1073–1081.

Yuvaraj, N.; Kanmani, P.; Satishkumar, R.; Paari, K.A.; Pattukumar, V. and Arul, V. (2011). Extraction, Purification and Partial Characterization of *Cladophora glomerata* Against.

Zandi, K.; Salimi, M. and Sartavi, K. (2007). *In vitro* Antiviral activity of Red Marine Alga from Persian Gulf, *Gracilaria slicornia*, against herpes simplex virus type 2. Journal of Biology Science, 7: 1274-1277.

Zandi, K.; Salimi, M. and Sartavi, K. (2007). *In vitro* Antiviral activity of Red Marine Alga from Persian Gulf, *Gracilaria slicornia*, against herpes simplex virus type 2. Journal of Biology Science, 7: 1274-1277.

Zhou, K. and YU, L. (2004). Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. Lebensm. Wiss. Technology, 37: 717–721.

The use of antibiotics in aquaculture has been limited. Scientists seeking for natural substitutes to prevent of aquatic animals diseases. Considering seaweeds are rich of nutritions and bioactive compounds, the propose of this study is: investigation the potential and use possibility of native seaweeds from Persian Gulf in shrimp aquaculture industry to improve growth, survival of postlarvae and to resistance against pathogens such as vibriosis. For this propose 7 macroalgae species from Bushehr province coast, including: green algae (*C.lyngbyi*), brown algae (*S.angutifolium* and *S.ilicifolium*) and red algae (*L.snyderiae*, *K.alvarezii* and *G.corticata*) were collected and identified. Then seaweed extracts obtained by Water, Ethanol, Methanol and Chloroform solvents by soaking method. *In vitro* antibacterial activity of extracts against Gr<sup>+</sup> bacteria (*S.aureus* and *B.subtilis*) and Gr<sup>-</sup> bacteria (*V.harveyi*, *V.alginolyticus* and *E.coli*) was conducted by Agar diffusion, MIC and MBC methods. Antioxidant activity also by DPPH and EC<sub>50</sub> methods was investigated. According to results of these two tests four seaweeds species (*S.angutifolium*, *L.snyderiae*, *K.alvarezii* and *G.corticata*) were selected for use in shrimp postlarvae (PL<sub>22</sub>) diets by Bio-Encapsulation (*Artemia* enrichment). Before of enrichment, toxicity effect of extracts to *Artemia* nauplii were evaluated by determination of LC<sub>50</sub> 24 h method. From results of this section Ethanol extracts were selected to bioencapsulation. After encapsulation shrimp postlarvae divided to 12 groups in triplicate, namely: C<sup>-</sup>, C<sup>+</sup>, S (200), S (400), S (600), L(200), L(400), L(600), G(300), G(600), K(300) and K(600). During 30 days of reared period C<sup>-</sup> and C<sup>+</sup> use of basal diet and unenriched *Artemia*, but the other groups use of basal diet and enriched *Artemia*. Except C<sup>-</sup>, the shrimps in first day of culture put in 10<sup>7</sup> cfu/ml *v.harveyi* suspension for 30 minutes, and after water exchange 10 ml of this dose was added to reared aquaria. After 30 days survival percentage, obtained weight and SGR% were investigated. To evaluate vibrio loadind, every 10 days 5 postlarvae were sampled randomly for vibrio count. Results showed that vibrio count in C<sup>-</sup> was less than the others and in C<sup>+</sup> was more than the others. In treatments vibrio count in L(200) was the most and L(600) was the less. Survival rate in C<sup>-</sup> was the most and after that G(600) with 79.4±6.6% and then S(300) and K(600) were 73.3±7.3% and

70.6±6.6% respectively that were significantly compare the other ( $P < 0.01$ ). Also the  $C^+$  was the less with 33.3±6.6% that difference was significant ( $P < 0.01$ ). In this study growth parameters of all groups that fed by enriched *Artemia* were better than  $C^+$  ( $P < 0.05$ ). After culture period 10 shrimp of every aquarium disinfected and reared for 10 days like before treatment. After 10 days the shrimps were challenged by  $3 \times 10^8$  cfu/ml *V.harveyi* and mortality was recorded for 7 days. The all of animals in  $C^-$  were survive but more than 90% of  $C^+$  were dead. And survival in all of treatments were better the  $C^+$  ( $P < 0.05$ ). the study showed the ethanol extracts of selected seaweed from Persian Gulf is a good source for growth, Survival and disease control in shrimp larviculture.

**IN THE NAME OF GOD**

The thesis by: **Dr. Aghil Dashtiannasab**

Entitled: **Investigation on possibility of survival and growth enhancing by selected seaweeds from Persian Gulf in post larvae shrimp *Litopenaeus vannamei* .**

Submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree **PhD in Fish Health and Diseases** has been evaluated and approved on **30 may 2015** by thesis committee as .....

**thesis committee**

**Dr. Mehrzad Mesbah, Associate professor of Fish Health and Diseases**  
(Supervisor)

**Dr. Rahim pyghan, professor of Fish Health and Diseases** (Advisor)

**Dr. Shapour Kakoolaki, Associate professor of Fish Health and Diseases**  
(Advisor)

**Dr. Mojtaba Alishahi, Associate professor of Molecular Genetic** (Referee)

**Dr. Darush Gharibi, assistant professor of Microbiology** (Referee)

**Dr.Jasem Ghefle Marammazi, Associate professor of Fisheries** (Referee)

**Dr.Gholam Hosein Khajeh, professor of Clinical Patology**(Referee)



**SHAHID CHAMRAN University Of AHVAZ**

**Faculty of Veterinary Medicine**

**PhD THESIS**

**Title:**

**Investigation on possibility of survival and growth enhancing by selected seaweeds from Persian Gulf in post larvae shrimp *Litopenaeus vannamei***

**THESIS SUPERVISORS:**

Dr. Mehrzad Mesbah

**THESIS Advisor:**

Dr. Rahim Pyghan

Dr. Shapour Kakoolaki

**by:**

Aghil Dashtiannasab

**MAY 2015**